

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'EFFET DE L'OBÉSITÉ ET DU DIABÈTE GESTATIONNEL SUR  
L'EXPRESSION DES PROTÉINES NIEMANN PICK C DANS LE PLACENTA  
HUMAIN À TERME

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MAREVA LEBOUCHER

JUIN 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les évaluateurs de ce mémoire d'avoir accepté d'être sur mon comité de mémoire et de prendre le temps de corriger ce projet de maîtrise.

La Dre Julie Lafond, ma directrice de recherche, je te remercie de m'avoir soutenue moralement tout au long de ce projet de maîtrise. Je te remercie aussi pour l'opportunité que tu m'as offerte de travailler sur un projet de maîtrise aussi intéressant.

La Dre Evemie Dubé, ma co-directrice qui même lorsqu'elle n'était plus présente au laboratoire et qu'elle était très occupée, a toujours trouvé le temps pour moi quand j'en avais le plus besoin. J'ai obtenu grâce à elle une formation exemplaire qui m'a permis de réaliser mon projet de recherche même quand elle n'était plus là. Elle a toujours eu une réponse à tous mes problèmes durant ce projet, et a toujours trouvé le temps de m'aider comme elle pouvait. Pour cela je te remercie énormément, et merci pour tous les bons conseils que tu m'a donnés.

Je remercie de plus mon conjoint qui m'a toujours soutenue et motivé jusqu'à la fin, ainsi que mes parents et mes frères et sœurs.

*Je dédie ce mémoire à mes parents Michel et  
Véronique Leboucher, qui m'ont toujours soutenue  
et qui m'ont montrée que lorsqu'on travaille dur  
On obtient toujours ce qu'on veut, et à mon  
conjoint Anapa Perez sans qui je ne  
serais pas ce que je suis  
aujourd'hui.*

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS .....	XII
RÉSUMÉ .....	1
INTRODUCTION .....	2
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE	
1.1 Le placenta, une interface foeto-placentaire .....	6
1.1.1 Le développement du placenta .....	6
1.1.2 Un organe multifonctionnel .....	9
1.1.3 Mécanismes du transport placentaire des lipides .....	15
1.1.4 Régulation du transport des nutriments.....	19
1.2 Les protéines Niemann Pick C .....	19
1.2.1 NPC1 .....	20
1.2.2 NPC2 .....	21
1.2.3 NPC1L1 .....	22
1.2.4 Mécanisme du transport intracellulaire du cholestérol .....	23
1.2.5 Régulation de l'expression des protéines NPC .....	25
1.2.6 Interaction entre les pathologies métaboliques et les protéines NPC.....	26
1.3 Hypothèses de Travail .....	28
1.4 Objectifs de travail.....	29
CHAPITRE II : L'ARTICLE SCIENTIFIQUE	
2.1 Résumé de l'article scientifique.....	31
2.3 Front Page.....	33

2.4	Abstract.....	34
2.5	Introduction.....	35
2.6	Materials and Methods .....	38
2.6.1	Subjects .....	38
2.6.2	Blood and tissue samples .....	38
2.6.3	Blood lipid dosage.....	39
2.6.4	Real Time RT-PCR .....	39
2.6.5	Total protein extraction .....	41
2.6.6	Western blot analyses.....	41
2.6.7	Statistical Analysis .....	42
2.7	Results .....	42
2.7.1	<i>Sociomedical parameters of normal weight, obese and GDM women ....</i>	42
2.7.2	<i>Lipid Dosage .....</i>	43
2.7.3	<i>NPC mRNA and protein expression in human full term placenta .....</i>	43
2.8	Discussion.....	44
	FIGURE LEGENDS .....	49
2.9	References.....	52
	FIGURES .....	56
	CHAPITRE III	
	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	59
3.1	DISCUSSION.....	59
3.2	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES .....	66
	BIBLIOGRAPHIE	

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1. Placental cells at the maternal-fetal interface .....	8
Figure 1.2 Le syncytiotrophoblaste, unité fonctionnelle de transport des lipides. ....	15
Figure 1.3 Rôle théorique des protéines Niemann Pick C dans le transport du cholestérol placentaire .....	24
Figure 2.1 Maternal plasma and newborn venous cord blood lipid profiles of CTL (18.5 < BMI < 24.9 kg/m <sup>2</sup> ), OB (BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> ) and GDM BMI women. ....	49
Figure 2.2 Maternal plasma and newborn venous cord blood lipid profiles of CTL (18.5 < BMI < 24.9 kg/m <sup>2</sup> ), OB (BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> ) and GDM women .....	49
Figure 2.3 Niemann Pick C mRNA and protein expression in human full-term placenta of CTL (18.5 < BMI < 24.9 kg/m <sup>2</sup> ), OB (BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> ) and GDM women.....	49

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Table 2.1 Primers used for qRT-PCR .....	40
Table 2.2 Sociomedical parameters of CTL ( $18.5 < \text{BMI} < 24.9 \text{ kg/m}^2$ ) OB ( $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ ) and GDM women. ....	51



## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ABCG1 : Transporteur ATP binding cassette sous famille G membre 1

ABCA1 : Transporteur ATP binding cassette sous famille A membre 1

ACAT : Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1

AKT : Protéine kinase B

ApoA1 : Apolipoprotéine A1

ApoB100 : Apolipoprotéine B100

BM : Membrane basale

CHOL : Cholestérol

COX2 : Cyclo-oxygénase 2

CT : Cytotrophoblaste

ERK ½ : Protéine kinase 1/2 régulée par un signal extracellulaire

FABP1 : Protéine de liaison aux acides gras 1

FABP3 : Protéine de liaison aux acides gras 3

FAT/CD36 : Translocase d'acide gras

FATP : Protéine de transport des acides gras

GDM : Diabète gestationnel Melitus

GLUT : Transporteur de glucose

HDL : Lipoprotéine de haute densité

hCG : Chorionique gonadotrope humaine

H-FABP : Protéine de liaison aux acides gras du coeur

hPL : Lactogène placentaire humaine

IR : Récepteur de l'insuline

IRS1 : Substrat du récepteur de l'insuline 1

RCIU : Restriction de croissance utérine

IGFII : *Insulin like growth factor 2*

LCPUFA : Acides gras à longues chaines polyinsaturées

LDL : Lipoprotéines de faibles densités

LDLR : Récepteur des lipoprotéines de faibles densités

L-FABP : Protéine de liaison aux acides gras retrouvés dans le foie

LGA : Large for gestational age

LPL : Lipoprotéine lipase

LXR : *Liver X receptor*

mTOR : *Mamalian target of rapamycin*

MVM : Membrane à microvillosités

NEFA : Acides gras non estérifiés

NPC1 : Protéine Niemann PiCk C type 1

NPC1L1 : Protéine Niemann Pick C type 1 like 1

NPC2 : Protéine Niemann Pick C type 2

OB : Obèses

PCSK9 : *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

p-FABPpm : Placental fatty acid binding protein plasma membrane / Protéine de liaison aux acides gras spécifique au placenta

PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PTHrp : *Parathyroid hormone-related protein*

RXR : Retinoid X receptor / récepteur X des rétinoïdes

SREBP : Sterol regulatory element-binding protein / Protéine de liaison aux éléments de réponses aux stérols

SRBI : Scavenger receptor class B member I / récepteur scavenger classe B membre I

ST : Syncytiotrophoblaste

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

TG : Triglycérides

TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha

VLDL : Very low density lipoprotein / lipoprotéine à très faible densité

VLDLR : Récepteur des lipoprotéines à très faible densité

MAPK : *Mitogen activated proteins kinase*

AC : Adénylate cyclase

PLC : Phospholipase C

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

$\mu\text{m}$  : Micromètre

$\mu\text{L}$  : Microlitre

L : Litre

mL : Millilitre

g : Gramme

$\mu\text{g}$  : Microgrammes

mg : Milligrammes

ng : Nanogramme

## RÉSUMÉ

L'obésité, caractérisée par une accumulation de gras dans les tissus, est un problème de santé publique grave. Elle est définie par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). D'après l'OMS, plus de 10% de la population mondiale est atteinte d'obésité dont 15% sont des femmes en âge de procréer en 2014. L'obésité est d'autant plus dangereuse car elle constitue un facteur de risque de développer chez les femmes enceintes des maladies cardiovasculaires, du diabète gestationnel (GDM), de la prééclampsie et peut engendrer des complications dans la croissance fœtale. De plus, les enfants peuvent être atteints de maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type 2, le syndrome métabolique, et peuvent souffrir de troubles cardiovasculaires à l'âge adulte. Ces complications peuvent entraîner la mort de l'enfant. Le GDM peut avoir lieu chez des femmes obèses ou d'IMC normal. C'est une complication de grossesse caractérisée par une augmentation de la glycémie à une concentration plus élevée que la teneur en glucose généralement présente chez les femmes enceintes. Cette complication de grossesse a des effets néfastes à la fois sur la mère et son fœtus. Il est donc important d'étudier le placenta pour comprendre l'impact de ces maladies sur le développement du fœtus et en limiter les effets. Notre laboratoire a précédemment démontré que le transport du cholestérol est altéré dans le placenta de femmes obèses et atteintes de GDM. Ici, nous avons étudié l'expression placentaire de protéines Niemann Pick C (NPC) qui transportent le cholestérol intracellulaire dans le foie, l'intestin et le cerveau. Nos hypothèses de travail sont que les protéines NPC sont exprimées dans le placenta humain et que l'obésité et le GDM modulent leur expression. Nous avons réalisé des RT-PCR en temps réel pour analyser l'expression des gènes *NPC1*, *NPC2* et *NPC1L1* et des immunobuvardages de type Western pour analyser leurs expression protéique. Nos résultats démontrent une augmentation des niveaux protéiques de NPC1 dans le placenta de femmes GDM, une diminution de l'expression protéique de NPC2 dans le placenta de femmes obèses ainsi qu'une diminution de NPC1L1 chez les femmes GDM par rapport aux contrôles. Il est donc clair que l'obésité et le GDM ont un impact sur l'expression des protéines NPC et, par conséquent, pourrait altérer le transport du cholestérol intracellulaire.

**MOTS CLÉS :** diabète gestationnel, obésité maternelle, protéines Niemann Pick C, RT-PCR en temps réel, immunobuvardage de type Western.

## INTRODUCTION

L'obésité est aujourd'hui une maladie répandue dans le monde entier et atteint des taux de plus en plus alarmants. Le taux d'obésité a doublé depuis 1980. En 2014, ce trouble touchait 13% des adultes de plus de 18 ans. De plus, 39% de la population adulte étaient en surpoids d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (<http://www.who.int/>). L'obésité est une maladie caractérisée par une augmentation de la masse grasse nuisant à la santé. Les personnes atteintes d'obésité possèdent un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup>, et celles considérées en surpoids entre 25 et 30 kg/m<sup>2</sup> (OMS) [1, 2]. Les femmes enceintes sont elles aussi touchées par l'obésité. En effet, un tiers de la population des femmes en âge de procréer souffrent d'obésité [3]. De plus, l'obésité chez les femmes enceintes est un facteur de risque pour qu'elles développent des complications de grossesse très graves et elle augmente ainsi le taux de mortalité fœtale [4]. Les complications de grossesse sont nombreuses. L'obésité augmente chez les femmes enceintes le risque d'avortement lors du 1<sup>er</sup> trimestre (jusqu'à 38,7%) ainsi que le risque de développer de l'hypertension, de la pré-éclampsie et du diabète gestationnel mellitus (GDM) au 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> trimestre (jusqu'à trois fois plus élevé que chez les femmes enceintes d'IMC normal) [4]. Ces femmes peuvent même développer des troubles cardiovasculaires, des troubles reproductifs ainsi que du diabète de type 2 après la grossesse [4-6]. L'obésité engendre également des troubles congénitaux qui se répercutent sur l'enfant [4, 7]. Les enfants nés de mères obèses peuvent ainsi souffrir d'obésité due à une adiposité accrue et de syndrome métabolique [4, 7-9]. Ils peuvent de même développer du diabète de type 2 et des troubles cardiovasculaires à l'âge adulte [4, 10]. Enfin, dans les cas les plus graves, l'obésité peut provoquer la mort à la naissance de l'enfant [11]. Le GDM est caractérisé par une intolérance au glucose et peut avoir des conséquences graves durant

la grossesse autant pour la mère que pour le fœtus. Cette complication touche 10% des femmes enceintes dans les pays occidentaux [12]. Les femmes atteintes de GDM peuvent développer du diabète de type 2 permanent après la grossesse. Les risques d'accouchement spontané et par voie césarienne sont aussi plus élevés pour ces femmes [12]. Le GDM augmente le risque chez l'enfant de développer de la macrosomie, le syndrome métabolique, de l'hypoglycémie néonatale, de l'obésité ainsi que du diabète plus tard [8]. L'obésité et le GDM représente donc des problèmes de santé publique grave qui préoccupent de plus en plus, d'autant plus que ces troubles métaboliques peuvent avoir des conséquences importantes sur la santé de l'enfant. Il est donc important d'étudier le placenta, qui assure le seul lien entre la circulation maternelle et fœtale durant la grossesse.

La grossesse est un évènement induisant de nombreuses modifications physiologiques chez la mère, afin d'assurer le développement adéquat du fœtus [13, 14]. Ces modifications chez la mère ainsi que le développement intra-utérin du fœtus, requièrent beaucoup d'énergie et ces besoins augmentent avec l'avancement de la grossesse [15]. De ce fait, le fœtus nécessite un approvisionnement continu en nutriments et en oxygène, dont certains ne proviennent que de la circulation maternelle grâce au placenta [13]. Le besoin en nutriments devient donc de plus en plus important chez la mère au cours de la grossesse [15]. Le placenta a donc un rôle déterminant pour le maintien et le bon déroulement de la grossesse, ainsi que pour le développement du fœtus [13, 14, 16]. Des modulations dans la régulation de ces mécanismes peuvent avoir ainsi un impact considérable sur la santé de la mère et de son fœtus [17, 18]. Il a été démontré que des perturbations du transport de nutriments placentaires ont un impact majeur sur la santé du fœtus, notamment dans le cas du GDM et de l'obésité [19, 20]. En effet, un excès ou une carence en lipides, glucides ou protéines conduisent au développement de maladies chez le fœtus tel que la restriction de la croissance intrautérine (IUGR) [10] ou bien une croissance trop importante (large for gestational age LGA) [10, 21]. Aujourd'hui, de nombreuses études montrent que les facteurs



influençant la grossesse ont également un impact sur la santé future de l'enfant pour des raisons encore peu connues. On sait aujourd'hui que le placenta est un joueur clé déterminant pour la santé du fœtus [18, 22, 23]. En effet, le placenta transporte les nutriments essentiels au développement intra-utérin du fœtus (les glucides, les lipides, les protéines et les sels minéraux) et les gaz respiratoires [17]. Ces éléments véhiculent dans la circulation maternelle et arrivent au placenta où ils sont transportés de part et d'autre de la barrière placentaire, jusqu'à la circulation fœtale [17, 22, 24].

Le métabolisme et le transport des lipides peuvent cependant être très affectés lors de troubles métaboliques durant la grossesse. Notre laboratoire ainsi que d'autres groupes de recherche ont précédemment démontré que des troubles métaboliques tels que le GDM et l'obésité affectent grandement l'expression des protéines impliquées dans le transport placentaire [25-28]. En effet, il est observé que le GDM augmente l'expression de certains récepteurs à lipoprotéines (SRBI, LDLR) et du transporteur de cholestérol ABCG1 mais diminuent l'expression du transporteur ABCA1 et de l'enzyme PCSK9 [26]. Notre laboratoire a aussi démontré que l'obésité module l'expression de protéines impliquées dans le transport des lipides durant la grossesse [25]. L'obésité provoque une augmentation de l'expression de FAT/CD36 (transporteur des acides gras) et de l'activité de l'enzyme LPL (lipoprotein lipase) ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines de liaisons aux acides gras FABP1 et FABP3 [25]. Ces modulations conduisent à une accumulation de cholestérol dans le placenta et peuvent avoir des conséquences graves pour le fœtus. En effet, l'accumulation de lipides conduisent à une augmentation de la synthèse de cholestérol et d'acides gras qui finissent par provoquer un stress oxydatif à l'intérieur de la cellule [29]. Ce stress oxydatif peut ensuite avoir un impact considérable sur le métabolisme du fœtus. C'est pourquoi il est important d'étudier et de comprendre l'impact des troubles du métabolisme sur le transport lipidique.

Le cholestérol est un lipide très important lors du développement fœtal. Durant la grossesse, la synthèse de cholestérol est augmentée suite aux besoins élevés de la mère et du fœtus [30, 31]. Dans ce projet de recherche, nous nous sommes concentrés sur le transport du cholestérol et, plus particulièrement, sur l'impact de l'obésité et du GDM sur les protéines de transport du cholestérol Niemann Pick type C 1 (NPC1), Niemann Pick type C1 like 1 (NPC1L1) et Niemann Pick type C2 (NPC2). Ces protéines font partie de la famille des protéines Niemann Pick type C (NPC) et sont hautement exprimées dans le cerveau, le foie et l'intestin. NPC1 et NPC2 transportent le cholestérol intracellulaire dans la voie endosomale/lysosomale pour transférer le cholestérol apporté par les lipoprotéines aux différents compartiments intracellulaire [32, 33]. Ces protéines ont été découvertes chez des patients atteints d'une maladie neurodégénérative autosomale récessive. Cette maladie est causée par une mutation des gènes *NPC1* et *NPC2* conduisant à des protéines non fonctionnelles, ce qui induit une accumulation lysosomale des triglycérides (TG), des dommages intracellulaires et des dommages cérébraux [32]. Une étude de Burke et al [34] a démontré que deux de ces protéines, NPC1 et NPC1L1 sont exprimées dans le placenta humain. Nos hypothèses sont que les trois protéines NPC1, NPC2 et NPC1L1 sont exprimées dans le placenta humain à termes, et que l'obésité et le GDM a un impact sur l'expression de ces protéines ce qui perturberait le transport du cholestérol placentaire.

## CHAPITRE I

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 1.1 Le placenta, une interface foeto-placentaire

##### 1.1.1 Le développement du placenta

L'implantation du blastocyste après l'étape de fécondation est l'étape clé de la formation du placenta. Une fois cette étape terminée, la couche cellulaire trophoblastique du blastocyste va proliférer rapidement, migrer et les trophoblastes vont former deux couches cellulaires dans l'endomètre de la mère : une couche de cytotrophoblastes (CT) interne et une couche externe. Ces deux couches cellulaires vont emprunter deux types de différenciation différentes : le type villeux et le type extravilleux [13, 23]

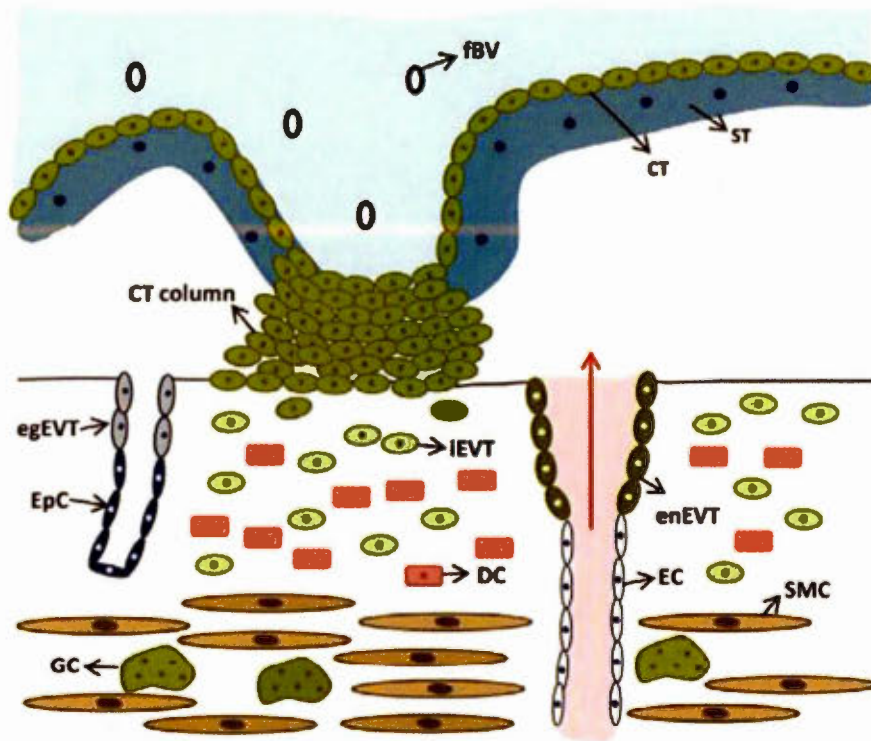
##### ➤ Différenciation des CT en CT extravilleux

Les CT vont proliférer et vont pénétrer la couche cellulaire externe appelée syncytiotrophoblaste (ST) et forment ainsi des colonnes de CT de type extravilleux. Cette section se retrouve ainsi à l'interface du compartiment fœto-maternel. Les CT extravilleux possèdent un caractère invasif dans la paroi utérine de la mère et vont remodeler le système sanguin. À ce moment, les CT se différencient en trophoblastes endovasculaires et envahissent les vaisseaux sanguins maternels [35]. La migration des CT extravilleux dans la décidua utérine de la mère est permise grâce à l'activité

sécrétrice de ces cellules. Effectivement, les CT extravilleux sécrètent des enzymes telles que de la collagénase de type IV, des métalloprotéinases, des  $\beta$ -glucuronidases, des aminopeptidases, de la cathepsine B et de l'UPA (activateur plasminogène de type urokinase). Ils sécrètent aussi le récepteur de l'UPA ainsi que de la laminine. Cet ensemble de protéines vont permettre de dégrader la matrice extracellulaire et de favoriser ainsi l'expansion des CT extravilleux dans la décidua maternelle. La sécrétion de ces enzymes est régulée par la production de facteurs de croissance par le placenta tel que le TGF- $\beta$  [13, 23].

#### ➤ Différenciation des CT en CT villeux

Les CT de type villeux ne possèdent pas de caractère migratoire. Après avoir proliférés et s'être différenciés, ces cellules vont fusionner avec le ST qui est la couche cellulaire externe formée grâce à la fusion de CT. Cette couche cellulaire va recouvrir les villosités chorioniques. La première ébauche des villosités, les villosités primaires sont formées à partir des invaginations du ST due à la migration des CT. Les villosités secondaires sont formées une fois que les invaginations sont faites grâce à l'expansion du mésenchyme fœtal. Enfin, les villosités tertiaires contiennent les capillaires fœtaux [13, 35].



**Figure 1.1 Placental cells at the maternal-fetal interface.** CT : cytotrophoblast; DC : decidua cell; EC : endothelial cell; egEVT : endoglandular extravillous trophoblast; enEVTs : endovascular; EpC : epithelial cell; EVT : extravillous trophoblast; fbV : fetal blood vessel; GC : giant trophoblast cells; iEVT : interstitial extravillous trophoblast; SMC : smooth muscle cell; ST : syncytiotrophoblast. Figure issue de Costa (2016) [35].

➤ Le placenta, un organe haemochorial

Durant le premier trimestre de grossesse, le placenta se développe dans un environnement dit pauvre en oxygène, due au système sanguin très limité. Cette condition est très importante pour la différenciation des CT au début de la grossesse ainsi que pour leur fonction [14]. La vascularisation du placenta ainsi que du fœtus

commence plus tard à partir de la 10<sup>e</sup> semaine de grossesse où le sang maternel se répand dans les artères spirales jusqu'à l'espace intervilloux. Le cordon ombilical recouvre l'artère qui envoie le sang désoxygéné ainsi que les déchets du fœtus aux villosités placentaires pour être éliminés, et une veine qui envoie le sang oxygéné de la circulation maternelle au fœtus. Cette vascularisation prend place une fois que la vasculogénèse et la formation des vaisseaux sanguins est terminée et permet d'échanger les gaz respiratoires, d'éliminer les déchets ainsi que d'échanger les nutriments pour la croissance du fœtus [13, 14].

### 1.1.2 Un organe multifonctionnel

Le placenta est organe complexe et possède de nombreuses fonctions non seulement pour le développement embryonnaire et du fœtus mais aussi pour le maintien et le bon déroulement de la grossesse. Ces deux processus demandent énormément d'énergie chez la mère [35].

#### 1.1.2.1 Fonction endocrine

Le placenta a une fonction hormonale très importante durant la grossesse. En effet, il sécrète des hormones nécessaires au maintien et au bon déroulement de la grossesse. Les hormones stéroïdes tels que l'œstrogène et la progestérone ont une fonction bien déterminée. La progestérone est sécrétée durant la grossesse par le placenta et permet de maintenir l'endomètre, de réduire l'activité myométriale, d'inhiber les réponses immunologiques de la mère contre les antigènes du fœtus et enfin est un précurseur pour la production d'hormones stéroïdes pour le fœtus [36]. Les

oestrogènes (l'oestrone E1, l'oestradiol E2 et l'oestriol E3) sont des hormones de croissance sécrétées par le placenta pour maintenir la croissance des organes reproducteurs chez la mère : la poitrine, l'utérus, et le vagin [13]. L'oestrogène permet aussi de maintenir la croissance de l'endomètre au cours de la grossesse. Elle régule la vasodilatation et l'angiogénèse pour conserver le flux sanguin dans la circulation maternelle et fœtale [35]. Le placenta ne produit pas uniquement des hormones stéroïdes. L'hormone hCG (human chorionic gonadotrophine) est une hormone lutéotrophique sécrétée uniquement durant la grossesse qui maintient le corpus luteum à produire de la progestérone [37]. Après 6 à 8 semaines, lorsque le placenta est capable de produire de la progestérone, le niveau d'hCG sécrétée diminue. Elle joue de plus un rôle dans la différenciation des CT au début de la grossesse. Le placenta sécrète une autre hormone appelée hPL (human placental lactogen) qui stimule la croissance des tissus mammaires afin de favoriser la lactation lorsqu'elle est libérée dans la circulation maternelle et stimule le développement embryonnaire lorsque libérée dans la circulation fœtale [14, 23]. Dans le placenta, il a été démontré qu'elle inhibe la sécrétion de leptine [38], une hormone sécrétée par le placenta à des taux élevés durant la grossesse [39]. Il a été démontré que hPL régule le métabolisme du glucose en augmentant sa disponibilité et son transport vers le fœtus [40].

#### 1.1.2.2 Un rôle protecteur et élimination des déchets

Le placenta possède de multiples fonctions mises en place grâce à une vascularisation importante entre la circulation maternelle et fœtale. Effectivement, le placenta a pour fonction d'oxygéner le fœtus en développement, de lui fournir l'eau nécessaire, les glucides, les acides aminés, les lipides, les vitamines et les minéraux nécessaires à sa croissance. Etant donné que le fœtus en développement possède des structures immatures, le placenta assume à sa place ces fonctions. En effet il est capable

de métaboliser des substances provenant de la circulation maternelle afin de les rendre utilisables par le fœtus. Il a de plus un rôle protecteur en éliminant la plupart des déchets métaboliques produits par le placenta et en formant une barrière physique empêchant les xénobiotiques et les infections/maladies d'être transmises au fœtus [13].

Le ST constitue la cellule endocrine et fonctionnelle du placenta et est composé de deux membranes par lesquelles les nutriments doivent traverser pour atteindre la circulation fœtale : la membrane à microvillosités (MVM), faisant face à la circulation maternelle, et la membrane basale (BM), faisant face à la circulation fœtale [41, 42].

#### 1.1.2.3 Transport des nutriments

Durant la grossesse, le métabolisme et le transport des nutriments à travers le placenta subit beaucoup de modifications qui sont influencées par de nombreux facteurs. Les principaux facteurs sont la tension d'oxygène et le flux sanguin dans l'espace intervilloux dont la composition change beaucoup au cours de la grossesse et influencent l'expression des protéines de transport clés [13, 17].

##### ➤ Gaz respiratoires

Le placenta a pour première fonction d'oxygéner le sang fœtal en permettant la diffusion directe de l'oxygène de la circulation maternelle à la circulation fœtale et du dioxyde de carbone de la circulation fœtale à la circulation maternelle pour son élimination. Afin de favoriser cet échange, l'hémoglobine présente dans la circulation fœtale possède une affinité pour l'oxygène plus élevée et pour le CO<sub>2</sub> plus faible que celle présente dans la circulation maternelle [13].



### ➤ Calcium

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est un élément essentiel pour la formation des os et pour la contraction musculaire. Le transfert du  $\text{Ca}^{2+}$  est alors crucial pour le développement squelettique du fœtus et constitue un important second messenger pour la signalisation intracellulaire [43]. Il a été démontré que le transfert du calcium augmente avec l'avancement de la grossesse [43]. Le  $\text{Ca}^{2+}$  traverse la membrane MVM à l'aide d'une pompe à  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant de l'ATP, et à un transporteur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger) [43]. A l'intérieur du placenta, la calmoduline, une protéine de liaison au calcium est exprimée et augmente le transfert du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane BM. La pompe  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante de l'ATP est aussi présente du côté fœtal au niveau de la membrane BM [44]. Le transfert du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers le placenta est hautement régulée. Il est régulé en premier lieu par les concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  qui module l'expression de protéines clés. Il est régulé par la voie des protéines kinases MAPK, l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase C (PLC) [45] et la calcitonine, une hormone hypocalcémique [46]. Les récepteurs de la calcitonine sont exprimées des deux côtés des membranes du ST [47].

### ➤ Glucides

Les glucides représentent la première source d'énergie utilisée par le fœtus. Le glucose est notamment le plus utilisé, dont la majeure partie provient de la circulation maternelle. La quantité de glucose synthétisée de novo par le fœtus est extrêmement faible étant donné qu'il n'est pas assez développé [16, 17]. C'est là qu'intervient le placenta. Il possède des transporteurs de glucose appelés GLUTs (glucose transporters) exprimés au niveau des deux membranes placentaires (MVM et BM). Ceci permet au glucose de traverser la MVM du ST face à la circulation maternelle, de traverser l'intérieur du placenta puis d'être libéré dans la circulation fœtale à travers la BM dans les capillaires fœtaux. Le transport du glucose à travers le placenta se fait suivant un gradient de concentration du glucose [13, 17]. Il existe plusieurs transporteurs de

glucose qui n'ont pas la même fonction physiologique : GLUT-1 a pour rôle de transporter le glucose au niveau des deux membranes du ST [45]. GLUT-3 est située uniquement au niveau des cellules endothéliales des capillaires fœtaux et aurait une fonction régulatrice du glucose libéré dans la circulation fœtale. GLUT-4 est un transporteur sensible à l'insuline qui a aussi une fonction régulatrice du glucose en favorisant le stockage du glucose dans les cellules sous forme de glycogène, lorsque le taux d'insuline augmente. GLUT-8 est un transporteur de glucose exprimé à la fin de la grossesse [13]. Le transport de glucose à travers le placenta est un mécanisme complexe sensible aux changements physiologiques qui se produisent durant la grossesse, c'est pourquoi il est étroitement régulé par des hormones de croissance (GH), des hormones stéroïdes et bien sûr par l'insuline [13, 16, 17].

#### ➤ Acides Aminés

Les acides aminés sont transportés à travers le placenta et peuvent être métabolisés par le fœtus afin de synthétiser des protéines. Étant donné que la concentration d'acides aminés est plus élevée dans la circulation fœtale que dans la circulation maternelle, leur transport se fait donc de manière active [17]. Il existe plusieurs types de transporteurs d'acides aminés qualifiés d'hétérodimériques ou bien monomériques exprimés dans le placenta. Les transporteurs hétérodimériques sont les suivants : les transporteurs du système L qui transportent les acides aminés neutres, les transporteurs du système  $y^+$  L qui échangent des acides aminés cationiques pour des acides aminés neutres et des ions sodium ( $Na^+$ ) et les transporteurs du système  $b^{0,+}$  qui transportent des acides aminés cationiques [17, 48]. Il existe deux isoformes du système L, LAT1 et LAT2, qui sont présents des deux côtés du ST, mais avec une prédominance au niveau de la membrane MVM [49]. Les transporteurs monomériques exprimés dans le placenta sont les suivants : transporteurs du système  $y^+$  qui transportent les acides aminés cationiques avec l'aide des ions  $Na^+$ , le système  $X^-$  qui transportent les acides aminés glutamate et aspartate (chargés négativement) par transport actif à l'aide d'un gradient ionique, le

système ASC dépendant du  $\text{Na}^+$  qui transporte les acides aminés comme alanine, sérine et cystéine qui sont neutres et enfin un autre transporteur d'acides aminés neutres dépendant du sodium, le système A [17, 48]. L'expression ainsi que l'activité des transporteurs des acides aminés dans le placenta est régulée par plusieurs facteurs tel que les hormones (stéroïdes, hormone de croissance GH, insuline), des cytokines ( $\text{TNF}\alpha$ , interleukine 6), mTOR et IGF II [17].

#### ➤ Lipides

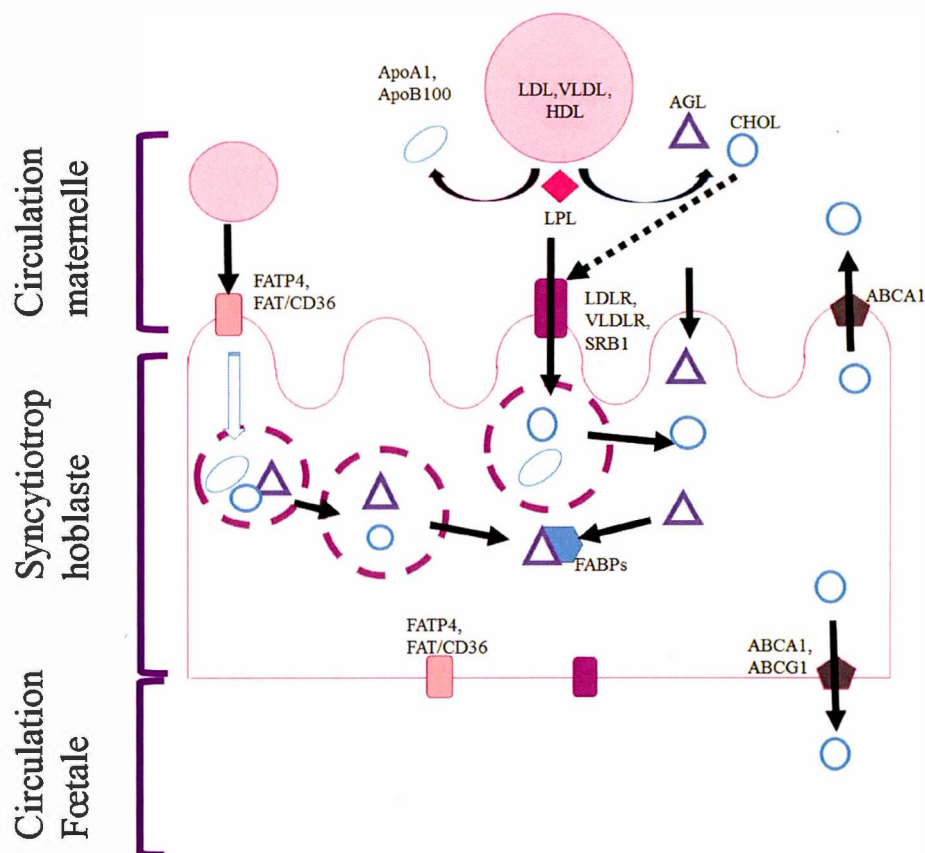
Les lipides constituent une source d'énergie métabolique importante pour le développement du fœtus [13]. Il existe plusieurs lipides important pour les processus biochimiques intracellulaires : les acides gras libres, les TG, les phospholipides, les glycolipides, les sphingolipides, le cholestérol, les cholestérols esters, les vitamines lipophiles, et tout autre composé protéique lié à des gras [13].

Le cholestérol fait partie des TG et est un élément essentiel pour le développement embryonnaire et fœtal. C'est un précurseur de nombreuses molécules bioactives importantes pour l'organisme tels que les hormones stéroïdes. Le cholestérol est aussi un lipide fondamental pour l'intégrité des membranes cellulaires, où il forme des microdomaines nécessaires pour les cascades de voies de signalisation intracellulaire [41].

Les acides gras sont utilisés pour conserver la fluidité des membranes cellulaires et la fonction des membranes dans la communication et signalisation cellulaire. Ils sont aussi utilisés comme précurseurs de composés bioactifs comme les prostacyclines et les prostaglandines [50]. Les acides gras sont essentiels pour le développement du fœtus en particulier les acides gras à longues chaînes polyinsaturées (LCPUFA), qui sont primordiaux pour le développement du cerveau [50, 51]. Etant donné qu'ils ne sont pas synthétisés par l'organisme, ils sont fournis par l'alimentation maternelle et sont transmis au fœtus par l'intermédiaire du placenta [50].

Etant donné que le fœtus ne peut pas synthétiser les lipides de novo, les lipides lui sont fournis par la mère via le placenta [13].

### 1.1.3 Mécanismes du transport placentaire des lipides



**Figure 1.2 Le syncytiotrophoblaste, unité fonctionnelle de transport des lipides.** FABP : Fatty acid binding protein, FATP: Fatty acid transport protein, CD36 : glycosylated FAT protein, LDL: low density lipoprotein, VLDL: very low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein, AGL : Acide gras libre, CHOL: cholestérol, SRBI : Scavenger receptor class B member 1, ABCA1: ATP-binding cassette subfamily A member1, ABCG1 : ATP binding cassette subfamily B member 1.

### 1.1.3.1 Transport des acides gras

Les acides gras se retrouvent dans la circulation maternelle soit non estérifiés (NEFAs) soit estérifiés sous forme de TG [17]. Les acides gras non estérifiés se déplacent dans la circulation liée à des protéines plasmatiques telle que l'albumine. Une fois arrivés aux microvillosités du ST, les acides gras libres liés à l'albumine peuvent directement traverser la membrane par diffusion passive [13] ou bien à l'aide de protéines de transport de la famille des FATP (fatty acid transport protein), FAT/CD36 (glycosylated FAT protein) [17, 50] et FABPpm (membrane fatty acid binding protein) [52, 53]. Les protéines de la famille des FATP les plus exprimées dans le placenta au niveau de la membrane MVM sont les FATP4 qui jouent particulièrement un rôle dans l'absorption des acides gras LCPUFA [17, 54]. FAT/CD36 est exprimé au niveau des deux membranes du ST, alors que pFABPpm est exprimée seulement au niveau de la membrane MVM [50, 52]. A l'intérieur de la cellule les acides gras vont être transportés à différents sites pour être estérifiés, subir une bêta-oxydation ou alors traverser la cellule à l'aide des protéines de liaison FABPs (fatty acid binding protein) pour être transportés vers la circulation fœtale [13, 17, 50]. Les protéines FABP sont H-FABP (heart-fatty acid binding protein) et L-FABP (liver fatty acid binding protein) qui ont été premièrement découvertes dans le cœur et dans le foie, respectivement [50]. Une autre protéine impliquée dans le transport placentaire des acides gras est la LPL qui est très importante pour l'absorption des acides gras NEFA, et dont on parlera plus loin dans la section du transport des TG [17].

### 1.1.3.2 Transport des TG

Les TG arrivent au placenta par la circulation sanguine, associés aux lipoprotéines. Il existe trois types de lipoprotéines : les lipoprotéines de faible densité LDL, de très faible densité VLDL et de haute densité HDL. Les lipoprotéines sont composées d'apolipoprotéines (Apo-B100, Apo-A1, ApoD ou ApoE) et de lipides (triglycérides ou cholestérol) [55, 56]. Leur composition en apolipoprotéines et en lipides est cependant différente. Les apolipoprotéines ont un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines car elles contribuent à leur solubilisation dans le plasma et permettent leur reconnaissance par les récepteurs spécifiques [57]. Les lipoprotéines (LDL, VLDL, et HDL), se lient à leurs récepteurs respectifs LDLR, VLDLR et SRBI (scavenger receptor type I) retrouvés sur la membrane du ST [41, 58, 59] et sont hydrolysées à la surface du ST sous l'action d'une enzyme appelée lipoprotéine lipase (LPL). Néanmoins SRBI ne se lie pas uniquement aux HDL mais aussi aux LDL [17]. À ce moment, le complexe lipoprotéique libère les acides gras libres non estérifiés (provenant des triglycérides) et les glycérols [60]. Les acides gras libres peuvent ensuite traverser le ST (voir section sur le transport des acides gras).

### 1.1.3.3 Transport du cholestérol

De même que les TG, le cholestérol est transporté dans la circulation maternelle jusqu'au placenta, associé à des lipoprotéines LDL, VLDL ou bien HDL. Une fois arrivées au placenta, les lipoprotéines se lient à leurs récepteurs spécifiques (LDLR, VLDLR et SRBI) respectivement [58, 59]. À cet instant, plusieurs voies d'absorption du cholestérol sont possibles. Le complexe lipoprotéine/cholestérol peut être internalisé par le placenta grâce à la liaison avec le récepteur FAT/CD36. Une fois

internalisé, le complexe se désagrège dans les endosomes/lysosomes à l'aide des endosomes lipases. Le cholestérol est transporté à l'extérieur des endosomes/lysosomes et les apolipoprotéines sont dégradées. À ce moment les récepteurs des lipoprotéines sont soit recyclés à la membrane MVM soit dégradés. Une fois à l'extérieur de la cellule, le cholestérol peut être utilisé par la cellule pour divers processus biologiques ou bien être transporté dans la circulation fœtale ou maternelle [58, 59]. Une deuxième voie possible est l'hydrolyse des lipoprotéines après leur liaison aux récepteurs, à l'aide de l'enzyme LPL. A partir de là, le cholestérol libre peut diffuser à travers le placenta. La famille des transporteurs ABC est aussi impliquée dans l'absorption et l'efflux du cholestérol dans le placenta. ABCA1 et ABCG1 sont des transporteurs de cholestérol exprimés dans le placenta. Stefulj *et al.* (2009) a démontré l'expression des deux transporteurs au niveau de la membrane MVM [61]. Néanmoins, Aye *et al.* (2010) a montré que ABCA1 était exprimé au niveau apical (MVM) et ABCG1 au niveau basal (BM) du ST [62]. L'expression de ces transporteurs au niveau des membranes placentaires reste encore à être élucidée. Ces transporteurs ont dans les deux cas un rôle dans l'efflux du cholestérol soit dans la circulation maternelle soit dans la circulation fœtale en fonction de leur expression [61, 62].

Le transport des lipides dans le placenta est régulé par de nombreux récepteurs nucléaires qui agissent comme des facteurs de transcription : PPAR  $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), RXR (rétinoid X receptor) [63], LXR (Liver X receptor)[64], et SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1) [65]. Ces éléments répondent aux concentrations intracellulaires des lipides en régulant l'expression des gènes impliqués dans le transport du cholestérol [63, 66].

#### 1.1.4 Régulation du transport des nutriments

Le transport des nutriments est régulé par plusieurs signaux présents dans la circulation maternelle (adipokines, hormones, et les nutriments) dans le placenta (cytokines, hormones, mammalian target of rapamycin (mTOR), peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs), signal transducers and activators of transcription (STATs)) mais aussi dans la circulation fœtale ((IGF II) insulin like growth factor II et parathyroid hormone-related peptide (PTHrp)) [17]. Une modification dans ce système de régulation peut avoir des impacts majeurs sur le développement du fœtus et engendrer des maladies graves tels que l'IUGR ou la LGA [17].

La voie endosomale/lysosomale du transport du cholestérol une fois que les lipoprotéines sont dégradées dans les endosomes tardifs/lysosomes est encore peu connue. En effet, on sait que le cholestérol estérifié sort de l'endosome tardif mais les protéines impliquées ne sont pas connues. Néanmoins on sait que dans d'autres cellules spécialisées, dans d'autres organes du corps tel que le foie, l'intestin et le cerveau, le transport du cholestérol intracellulaire est connu et les protéines impliquées dans ce transport sont celles de la famille Niemann Pick C (NPC).

#### 1.2 Les protéines Niemann Pick C

Une fois que les LDL-cholestérol (lipoprotéine liée au cholestérol) sont absorbées par les cellules, ils sont ensuite hydrolysés dans les endosomes tardifs/lysosomes (LE/LY). Ce cholestérol libre est estérifié et est transporté à l'extérieur des LE/LY dans le cytoplasme où il va être redirigé vers les différentes organelles de la cellule pour être utilisé par la cellule. Les protéines NPC sont impliquées dans le transport du



cholestérol via la voie intracellulaire des lysosomes/endosomes dans le foie, l'intestin et le cerveau. Les deux protéines NPC impliquées dans la voie endosomale du cholestérol sont NPC1 et NPC2 [67]. Ces protéines ont été découvertes chez des patients atteints d'une maladie neurodégénérative appelée Niemann Pick C. C'est une maladie autosomale récessive due à une accumulation de lipides tels que de cholestérol non estérifié, des sphingolipides, et des glycolipides dans les lysosomes des cellules du foie, de l'intestin et du cerveau [68, 69]. Les symptômes de cette maladie sont une neurodégénérescence, une hépatosplénomégalie, qui peuvent provoquer la mort des patients [70]. Des études génétiques ont montré que l'accumulation de lipides est causée par des mutations des gènes *NPC1* et *NPC2*. 95% des cas de maladie sont causés par une mutation du gène *NPC1* et 5% sont causés par une mutation de *NPC2* [71]. Ces mutations modifient la structure des protéines les rendant non fonctionnelles [72]. Pentchev *et al.* (1994) ont montré qu'il y avait un défaut dans l'estérification du cholestérol dans des fibroblastes NPC déficients [73]. A partir de là, de nombreuses études ont confirmé le rôle des protéines NPC dans le foie, l'intestin et le cerveau chez l'humain [33, 74-80].

### 1.2.1 NPC1

La protéine NPC1 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée au niveau des membranes plasmiques des endosomes tardifs et des lysosomes [81, 82]. C'est une glycoprotéine de 1278 acides aminés d'un poids moléculaire d'environ 142kDa [71]. NPC1 possède de plus 14 sites de glycosylation chez l'humain et la souris [71]. Elle possède un domaine SSD (sterol-sensing domain) homologue à toutes les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol comme par exemple NPC1L1 (NPC1 like protein 1) ou la HMG-CoA reductase qui intervient dans la synthèse du cholestérol [71, 83, 84]. Ce domaine est nécessaire à ces protéines pour la liaison avec le

cholestérol [81, 83]. La protéine NPC1 possède aussi un domaine hydrophile à son extrémité N-terminale, qu'on appelle NPC domaine (NTD). Le domaine NTD confère à la protéine une hétérodimérisation et se retrouve aussi dans la partie luminale des endosomes/lysosomes [33, 72]. Le domaine NTD est responsable de la liaison avec le cholestérol [85, 86]. NPC1 peut se lier de même aux dérivés du cholestérol. Il est important de noter que NPC1 lie le cholestérol à son extrémité 3 $\beta$ -hydroxyle (3 $\beta$ -OH) laissant le côté isooctyl libre pour la liaison à NPC2 [85]. NPC1 est exprimé dans tous les tissus de l'organisme avec une expression plus élevée dans le foie [33] et dans le placenta [34].

### 1.2.2 NPC2

La protéine NPC2, aussi connue sous le nom de HE1 au niveau de l'épididyme [75], est une glycoprotéine soluble, localisée à l'intérieur des LE/LY. NPC2 est exprimée de manière ubiquitaire [74-77]. Cette protéine est aussi sécrétée dans le lait, la bile ainsi que dans le plasma [87]. C'est une petite protéine de seulement 132 acides aminés qui possède trois sites de glycosylation [87]. NPC2 lie le cholestérol au niveau de la chaîne isooctyl (qui est hydrophobe). Cette conformation fait en sorte que NPC1 et NPC2 lie le cholestérol de manière opposée, afin de favoriser le transfert du cholestérol entre NPC2 et NPC1 [85, 88]. Son expression dans le placenta n'est pas connue.

### 1.2.3 NPC1L1

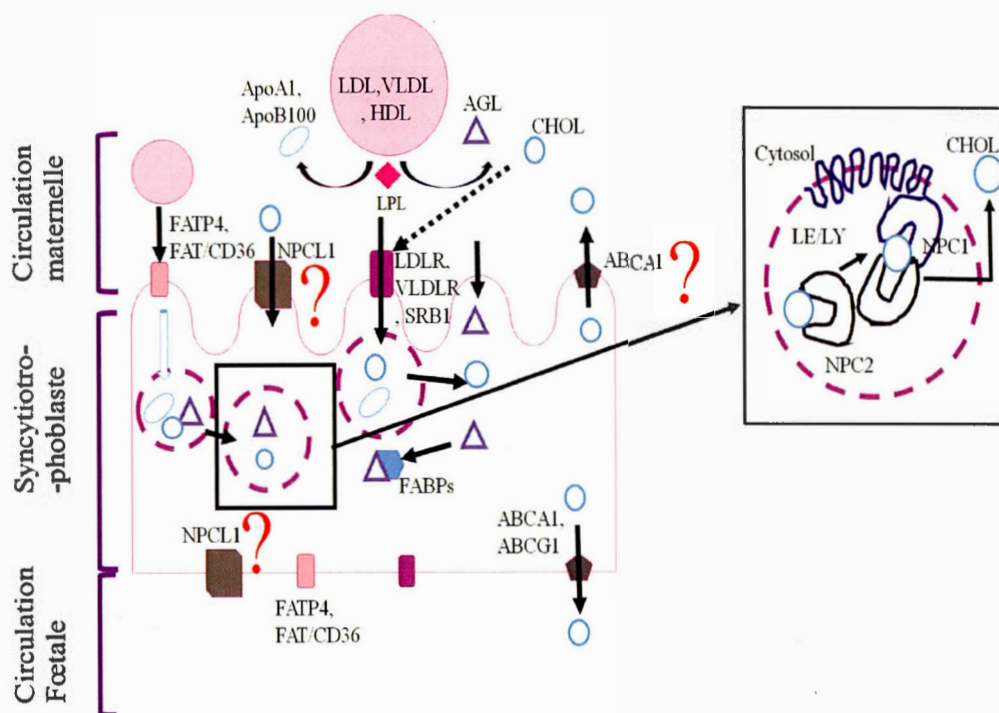
NPC1L1 est une protéine impliquée dans l'homéostasie du cholestérol. Elle a été découverte due à son homologie avec NPC1. Leur différence repose sur leur localisation dans la cellule. NPC1L1 est une protéine transmembranaire contenant 13 domaines transmembranaires, mais qui est exprimée au niveau de la membrane plasmique cellulaire et non dans les endosomes tardifs et lysosomes. Elle possède aussi un peptide signal similaire à NPC1 avec un domaine N-terminal (NTD) et un domaine sterol sensing (SSD) [78]. Des études ont cependant montré que NPC1L1 ne se retrouve pas uniquement au niveau de la membrane plasmique mais transit entre les compartiments intracellulaires et la membrane cellulaire, un phénomène qui dépend du métabolisme du cholestérol [78]. NPC1L1 est hautement exprimée dans le petit intestin, où elle a pour rôle d'absorber le cholestérol intestinal [78, 79] et dans le foie [80]. Dans le petit intestin, NPC1L1 est exprimée au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes où elle absorbe le cholestérol alimentaire à l'intérieur de la cellule. Au niveau du foie, elle est exprimée au niveau de la membrane cellulaire des hépatocytes dans les canalicules biliaires où elle réabsorbe le cholestérol biliaire [78]. NPC1L1 absorbe le cholestérol du milieu extracellulaire par endocytose médiée par des récepteurs. Elle a pour fonction principale d'absorber le cholestérol alimentaire et de diminuer la perte de cholestérol en le réabsorbant des canalicules biliaires [78]. Burke *et al.* 2009 ont montré qu'elle était exprimée dans le placenta humain et d'hamster [34].

#### 1.2.4 Mécanisme du transport intracellulaire du cholestérol

Comme nous l'avons précisé dans la section sur le transport du cholestérol, le cholestérol est transporté dans la circulation sanguine lié aux lipoprotéines. Une fois arrivé aux cellules nécessitant du cholestérol, les LDL-cholestérol sont internalisées [89]. Une fois internalisées par endocytose médiée par un récepteur spécifique, les LDL-cholestérol à l'intérieur des LE/LY sont hydrolysés, et le cholestérol se retrouve sous forme non estérifiée. Afin de pouvoir être utilisé par la cellule, le cholestérol non estérifié doit sortir des LE/LY, une action réalisée par les protéines NPC. Sous la forme non estérifiée, le cholestérol expose une extrémité 3  $\beta$ -OH<sup>-</sup> où va se lier la protéine NPC2. NPC2 ne peut pas traverser la bicouche lipidique de la membrane plasmique de l'endosome due à son caractère hydrophile. NPC2 transfère alors le cholestérol à la protéine NPC1 transmembranaire au niveau de la membrane des LE/LY. NPC1 contrôle ensuite l'efflux du cholestérol à l'extérieur des lysosomes, afin qu'il soit redistribué vers les compartiments cellulaires pour exercer son rôle [67, 90]. Le niveau de cholestérol intracellulaire module l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Par exemple, le niveau de cholestérol non estérifié stimule l'expression de l'enzyme acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT), pour son estérification au réticulum endoplasmique (RE) [72].

Le mécanisme de transport dans la voie endosomale/lysosomale du cholestérol est connu et a été démontré dans le foie, l'intestin et le cerveau. Cependant, les mécanismes du transport intracellulaire du cholestérol dans le placenta ne sont pas connus même si le mécanisme d'absorption du cholestérol médiée par la liaison des LDL-CHOL/ LDLR est le même. Burke *et al.* (2009) [34] ont étudié l'impact d'un régime élevé en cholestérol chez des hamsters sur la quantité de cholestérol transporté au fœtus, et l'impact sur l'expression des protéines impliquées dans le transport du cholestérol dont NPC1 et NPC1L1. Ils ont démontré que l'expression de NPC1 diminue

avec un régime alimentaire supplémenté en cholestérol alors que NPC1L1 augmente. Ceci démontre que ces protéines sont sensibles au métabolisme du cholestérol [34]. Néanmoins leur rôle dans le placenta humain n'a pas encore été démontré, mais on suppose que le mécanisme de transport dans le placenta serait le même que dans le foie (Figure 1.2).



**Figure 1.3 Rôle théorique des protéines Niemann Pick C dans le transport du cholestérol placentaire.** FABP : Fatty acid binding protein, FATP: Fatty acid transport protein, CD36 : glycosylated FAT protein, LDL: low density lipoprotein, VLDL: very low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein, AGL : Acide gras libre, CHOL: cholestérol, SRBI : Scavenger receptor class B member 1, ABCA1: ATP-binding cassette subfamily A member1, ABCG1 : ATP binding cassette subfamily B member 1, NPC1 : Niemann Pick-C de type 1, NPC2 : Niemann pick-C de type 2, NPC1L1: Niemann Pick-C 1 like 1. LE/LY : Endosome tardif/Lysosome.

### 1.2.5 Régulation de l'expression des protéines NPC

L'expression de la plupart des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides sont régulées par le niveau de stérols intracellulaire. La séquence des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides possèdent dans leur région promotrice une séquence élément de réponse appelée *sterol regulatory element binding site* où se lient des facteurs de transcription tel que SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) en réponse à une augmentation ou une diminution des stérols intracellulaire [72]. Il a été reporté que NPC1 est hautement régulée au niveau post-transcriptionnel par le récepteur nucléaire LXR qui augmente l'expression de l'ARNm ainsi que de la protéine NPC1 [33]. Yu *et al.* (2012) a de plus montré que les Ox-LDL (lipoprotéines LDL oxydées) augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine NPC1 dans les macrophages [33, 91]. Cette amplification est médiée par la voie intracellulaire ERK1/2 / COX2 /PPAR $\alpha$ , une voie de signalisation connue pour son implication dans le métabolisme des lipides [91]. L'expression génique et protéique de NPC1 est aussi régulée par les acides gras alimentaires par rétrocontrôle négatif médiée par la voie de signalisation de SREBP [33]. L'expression de NPC1 est de plus régulée au niveau traductionnel par des petites molécules d'ARN appelés micro ARN (miARN) qui se lient à l'ARNm et modifient son expression. Dans ce cas, l'expression du ARNm de NPC1 est régulée à la baisse par les miR33a et b [33]. La protéine NPC1 impliquée dans la maladie Niemann Pick C est une protéine mal repliée due à une mutation génétique qui provoque la traduction d'une protéine non fonctionnelle mal repliée. Il a été démontré que cette protéine mutante est reconnue par le protéasome et est donc dégradée [92]. Du *et al.* (2015) ont montré récemment que la dégradation médiée par le protéasome est activée par la signalisation Akt [93].

Quant aux protéines NPC2 et NPC1L1, il se trouve que NPC1L1 régule l'expression protéique de NPC2 [94]. En effet, les deux protéines ont des rôles

antagonistes. Dans le foie, NPC2 est sécrétée dans la bile et stimule la sécrétion biliaire du cholestérol en favorisant l'export de cholestérol par les transporteurs ABCG5 et ABCG8 [95, 96]. Yamanashi *et al.* (2012) ont montré que NPC1L1 inhibe la maturation protéique de NPC2 en augmentant la dégradation protéique de NPC2. Cette inhibition diminuerait la sécrétion biliaire du cholestérol ce qui confirme le rôle de NPC1L1 qui est de réabsorber le cholestérol biliaire pour éviter la perte de cholestérol [94].

NPC1L1 est régulé au niveau transcriptionnel par SREBP en réponse au cholestérol intracellulaire dans des lignées cellulaires [78]. Il se pourrait de plus qu'elle soit régulée par de nombreux récepteurs nucléaires étant impliqués dans la régulation de l'absorption intestinale du cholestérol : PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , LXR et RXR [78]. D'après toutes ces informations, ces protéines étant impliquées dans le métabolisme et transport du cholestérol sont étroitement régulées par les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme des lipides. Étant donné que l'altération de ces voies de signalisation est un trait caractéristique dans les troubles métaboliques comme le diabète de type II, l'obésité et l'hypercholestérolémie mais aussi dans le diabète gestationnel chez les femmes enceintes, il est important de connaître l'impact de ces troubles métaboliques sur l'expression des protéines NPC.

## 1.2.6 Interaction entre les pathologies métaboliques et les protéines NPC

### 1.2.6.1 La résistance à l'insuline et diabète de type 2

De nombreuses études ont démontré qu'il existait un lien entre la résistance à l'insuline et l'expression des protéines NPC. En effet, Vainio *et al.* (2005) ont montré dans des modèles cellulaires et dans des hépatocytes et des cerveaux de modèles animaux NPC (-/-) que l'expression du récepteur de l'insuline (IR insulin receptor) est surexprimée et qu'une perturbation de la signalisation de l'insuline a lieu. Ces résultats

s'expliquent par le fait que l'activation des récepteur IR est perturbée dans les hépatocytes NPC (-/-), et causerait donc une augmentation de l'expression du récepteur IR afin de compenser cette inactivation [97]. Fletcher *et al.* (2014) ont aussi démontré une interaction entre NPC1 et la résistance à l'insuline dans une lignée d'adipocytes 3T3-L1. Néanmoins les résultats obtenus ne coïncident pas avec les études précédentes : ils ont montré que l'inhibition de NPC1 dans les cellules 3T3-L1 provoquant une perturbation du transport du cholestérol, conduit au final à une diminution de la réponse à l'insuline. Cette diminution est due à une réduction du récepteur à l'insuline IR et de IRS1 (insulin receptor substrate 1) [98].

NPC1L1 est aussi impliquée dans la résistance à l'insuline. Effectivement, une surexpression de la protéine NPC1L1 conduit à une accumulation de cholestérol libre dans les hépatocytes. Cette accumulation conduit à une résistance à l'insuline à travers la production d'un stress oxydatif [99]. Cette étude propose de plus que cette résistance à l'insuline se ferait à travers la signalisation Akt [99]. Étant donné que la résistance à l'insuline est présente dans les troubles métaboliques de l'obésité et le diabète gestationnel, il serait intéressant d'étudier le lien entre ces protéines et la résistance à l'insuline dans le concept de ces troubles.

#### 1.2.6.2 Interaction entre l'obésité et l'expression des protéines NPC

Plusieurs études ont démontré une association entre le polymorphisme du gène *NPC1* et le développement de troubles métaboliques [100, 101]. Garver *et al.* (2008), ont réalisé une étude génomique (Genome Wide association Study, GWAS) et ont trouvé des locus susceptibles d'augmenter les risques du développement de diabète et de l'obésité dans les allèles de *NPC1* [101]. Jelinek *et al.* (2015) ont démontré chez un modèle de souris C57BL/6J NPC1 que la diminution de l'expression génique de *NPC1*



prédispose ces modèles de souris à développer une intolérance au glucose ainsi qu'un gain de poids lorsqu'elles suivent un régime élevé en gras. Cette étude montre ainsi une interaction entre le régime alimentaire et l'expression de *NPC1* ce qui pourrait causer le développement de troubles métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2 [102]. À la suite de ces résultats, Bambace *et al.* (2013) [103] ont donc voulu confirmé cette hypothèse basée sur le fait qu'une réduction de l'expression génique du gène *NPC1* fonctionnel est en lien avec le gain de poids chez des souris [104, 105]. Bambace *et al.* (2013) ont démontré que l'expression de l'ARNm et de la protéine NPC1 est augmentée significativement dans le tissu adipeux blanc d'hommes et de femmes obèses comparés à des hommes et des femmes contrôles non obèses [103].

### 1.3 Hypothèses de Travail

D'après les nombreuses études publiées sur l'expression des protéines Niemann Pick C, leur rôle dans le transport des lipides dans le foie, l'intestin, et le cerveau ainsi que leur lien avec le développement des troubles métaboliques, nos hypothèses de travail sont les suivantes :

1. NPC2 est exprimée dans le placenta humain à terme, de même que NPC1 et NPC1L1
2. L'expression de NPC1 et NPC2 est sous exprimée dans le placenta de femmes atteintes d'obésité et de diabète gestationnel
3. L'expression de NPC1L1 est surexprimée dans le placenta de femmes atteintes d'obésité et de diabète gestationnel

#### 1.4 Objectifs de travail

Afin de vérifier nos hypothèses, les objectifs de travail sont :

1. De vérifier que les gènes et protéines Niemann PiCk C sont exprimés dans le placenta humain à terme de femmes d'IMC normal.
2. De quantifier l'expression de l'ARNm et des protéines NPC1, NPC2 et NPC1L1 dans le placenta humain à terme de femmes atteintes d'obésité, de diabète gestationnel ainsi que des femmes d'IMC normal.
3. De comparer les résultats entre eux afin de déterminer si les troubles métaboliques ont un impact sur l'expression de ces protéines.

## CHAPITRE II : L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

## 2.1 Résumé de l'article scientifique

L'obésité est une maladie répandue partout dans le monde et représente donc un problème de santé publique majeur. Elle est caractérisée par une accumulation de gras dans les tissus et est définie par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). D'après l'OMS, plus de 10% de la population mondiale était atteint d'obésité en 2014, dont 15% étaient des femmes en âge de procréer. L'obésité est un facteur de risque pour développer des complications de grossesse graves pour les femmes enceintes et leurs fœtus. Les femmes enceintes atteintes d'obésité peuvent souffrir de maladies cardiovasculaires, de diabète gestationnel mellitus (GDM) et de prééclampsie. Leurs enfants peuvent souffrir à leur tour de syndrome métabolique, de maladies cardiovasculaires, d'obésité et de diabète de type 2 plus tard dans la vie. Le placenta est énormément étudié afin de comprendre l'interaction entre les troubles de grossesse et le développement du fœtus. Il a déjà été démontré que le transport du cholestérol est altéré dans le placenta de femmes atteintes d'obésité et de celles atteintes de GDM. Ici, nous avons étudié l'expression des protéines Niemann Pick C (NPC) du transport intracellulaire du cholestérol, dans le placenta de femmes obèses, d'IMC normal et de femmes GDM. Nos hypothèses sont que les protéines NPC sont exprimées dans le placenta humain et que l'obésité et le GDM modulent leur expression. Nous avons réalisé des RT-PCR en temps réel pour analyser l'expression des gènes *NPC1*, *NPC2* et *NPC1L1* et des immunobuvardages de type Western pour analyser leur expression protéique. Nos résultats démontrent une augmentation des niveaux protéiques de NPC1 dans le placenta de femmes GDM et obèses, une diminution de l'expression protéique de NPC2 dans le placenta de femmes obèses ainsi qu'une diminution de NPC1L1 chez les femmes GDM et obèses. Pour conclure, cette étude démontre l'impact des troubles métaboliques sur les protéines NPC et sur le transport du cholestérol intracellulaire.

## 2.2 Contributions de l'étudiante à l'article

### Ce qu'elle a fait

- Extraction des protéines de tissu placentaire
- Extraction d'ARN totaux de tissu placentaire
- RT-PCR en temps réel
- Immunobuvardage de type Western
- Analyse des résultats
- Rédaction de l'article scientifique

### Ce qu'elle n'a pas fait

- Recrutement des femmes enceintes et collecte des échantillons sanguins
- Collecte des placentas
- Compilation des données des questionnaires socio-médicaux
- Dosage des lipides dans le plasma sanguin
- Compilation des données des dosages lipidiques plasmatiques

## 2.3 Front Page

### EFFECT OF MATERNAL OBESITY AND GESTATIONAL MELLITUS DIABETE ON NPC EXPRESSIONS IN HUMAN FULL TERM PLACENTA

Mareva Leboucher <sup>1,2\*</sup>, Evemie Dubé<sup>3\*</sup>, Jean-Claude Forest<sup>4</sup>, Yves Giguère<sup>4</sup> and Julie Lafond<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Département des Sciences Biologiques de l'Université du Québec à Montréal (UQÀM), <sup>2</sup>Centre de Recherche BioMed, <sup>3</sup>Centre hospitalier Universitaire Sainte Justine (CHUSJ) and <sup>4</sup>Hopital St-François D'Assise (CHUQ).

<sup>1</sup>Grant support: This work was supported by a CHIR and NSERC research grant to JL. ED is the recipient of a post-doctoral scholarship from the FRQ-S.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed:

Julie Lafond PhD  
Laboratoire de Physiologie Materno-Fœtale  
Centre de Recherche BioMed  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succursale Centre-ville  
Montréal, Canada, H3C 3P8  
Fax: (514) 987 4647  
Email: lafond.julie@uqam.ca

## 2.4 Abstract

Obesity is a world-wide spread epidemic disorder. Today, over 10% of world population is obese. Obesity is characterized by an accumulation of fat tissue. Obese (OB) subjects are defined by their body mass index (BMI) which is greater than 30 kg/m<sup>2</sup> according to criteria of the world health organisation (WHO). Obesity also affects women in reproductive age. In fact, 15 % of obese subjects are women in reproductive age. Maternal obesity is a risk factor for those women to develop pregnancies complications like gestational diabete mellitus, preeclampsia, cardiovascular diseases and they can suffer later in life of type 2 diabete. Maternal obesity is not only dangerous for the mother, but for her child too. Both are at risk of developing health problem such as metabolic syndrome, type 2 diabete, and cardiovascular diseases later in life. Studies have previously shown that metabolic diseases like obesity (OB) and GDM induce cholesterol metabolism and transport in the placenta. In this study, we have studied protein and gene expression of cholesterol transporters, the Niemann Pick C proteins (NPC) known to be involved in intracellular cholesterol trafficking in the liver, intestine and brain, in the placenta of normal weight (n=8), obese (n=9) and GDM (n=6) women. We realized RTq-PCR and Western blot analyses. Even if no significant results were shown, great trends were observed. Western blot analyses revealed a decreased expression of NPC2 in placentas of obese women compared to normal weight women as well as a reduced expression of NPC1L1 in placentas of GDM and OB women. NPC1 proteins levels were higher in placentas of GDM and OB women. Additional experiments would be necessary to elucidate and study the mechanisms involved.

## 2.5 Introduction

Obesity is a world-wide spread epidemic and has become a major public health issue. Since 1980, the rate of obesity has doubled. In 2014, 13 % of adults older than 18 years old were obese and 39 % were overweighted (World health organisation WHO) (<http://www.who.int/>). Obesity is characterized by an accumulation of fat tissue which can cause important health issues such as cardiovascular diseases, arteriosclerosis or type 2 diabetes. Obese subjects, according to the WHO, have a body mass index (BMI) greater than  $30\text{kg/m}^2$  whereas overweight subjects have a BMI between 25 to  $30\text{kg/m}^2$  [1, 2]. Furthermore, a third of women of reproductive age are obese [3]. These women are particularly at risk during pregnancy developing complications such as gestational diabetes mellitus (GDM), preeclampsia, cardiovascular diseases and even suffer from increased maternal and fetal-death rates [4-6]. Studies have previously shown that children born to obese women are more susceptible to develop increased adipose tissue, and the metabolic syndrome [7-9]. Moreover, studies demonstrated that those children also tend to develop cardiovascular diseases, type 2 diabetes and obesity, growing up [4, 10]. GDM is a pregnancy complication which can appear during pregnancy and obese women are at much greater risk to have this problem. Pregnant women are naturally in a glucose intolerance state, but at higher level, this intolerance state is harmful to the mother and the fetus. 10% of west countries pregnant women suffer from GDM [11]. Those numerous studies have proved that obesity and GDM are in fact a real public health issue that must be taken into account for.

The development of the fetus and the adaptive changes in the mother's body during pregnancy require a lot of energy. These changes are critical for the well-being of both the mother and the fetus [11-13]. The functional site of the placenta, representing the single link between the maternal and fetal blood circulation, is the syncytiotrophoblast (ST) [12, 14]. The ST is an exchange area comprising different complex nutrients'



transport systems that are tightly regulated [12, 15]. A slight modification in these regulatory mechanisms could have major consequences on placental functions as well as on the maternal and fetal health [16, 17]. The placenta provides respiratory gas and essential nutrients (carbohydrates, lipids and proteins) to the fetus to satisfy its needs. Those nutrients are transported from the maternal circulation to the fetal circulation through the ST [16]. The ST is a single multinucleated cell that has two plasma membranes : the microvillous membrane (MVM) facing maternal blood, and the basal plasma membrane (BM), facing fetal blood. Nutrients must cross the MVM with specific transporters, then cross intracellular compartment, and finally they must be transported across the BM for fetal metabolism [16, 18].

Lipid metabolism is essential during pregnancy due to the increased needs in lipids as the fetus develop [19, 20]. Evidences show that placental lipid metabolism and transport are modulated in metabolism diseases like GDM and obesity [18]. Studies have demonstrated that GDM and obesity modulate lipid transporters or lipid related protein placental expressions [21-24]. SRBI, LDLR and ABCG1 proteins expressions are higher in GDM women placenta whereas ABCA1 and PCSK9 proteins expressions where reduced in GDM women placenta [22]. Furthermore, their results showed that FAT/CD36 protein expression and LPL activity were greater in placenta of obese women compared to normal weight women, while FABP1 and FABP3 proteins expressions were reduced in placenta of obese women [21]. All those proteins are involved in cholesterol transport and metabolism. Those modulations induce cholesterol placental accumulation which may have serious consequences like oxydative stress, on fetus' health [25].

Cholesterol (CHOL) is transported in the blood circulation through LDL, HDL and VLDL lipoprotein particles. The placenta expresses the lipoprotein receptors LDLR, SRBI and VLDLR specific to LDL, HDL and VLDL. Lipoprotein binding stimulates receptor mediated endocytosis of lipoprotein/receptor complex into the placenta [26,

27]. The CHOL/LDL/LDLR complex is then hydrolyzed in late endosome/lysosome to free lipids which can exit to be used by the cell [26, 27]. This endocytic pathway is not well-known in the placenta. Niemann Pick C (NPC) proteins are CHOL trafficking protein family ubiquitously expressed but higher levels were found in liver and intestine [28-31]. NPC1 and NPC2 are expressed respectively on lysosomal membrane and in lysosomal luminal [32]. NPC1 and NPC2 mutations have been found in patients with Niemann Pick C disease which is a lysosomal lipid accumulation disorder [33, 34]. Niemann Pick C1 Like 1 (NPC1L1) which is highly expressed in small intestine and on hepatocyte membrane, mediates cholesterol absorption [29, 35]. Burke et al. (2009) have shown that NPC1 and NPC1L1 are expressed in hamster and human placenta [36].

The aim of this study is to confirm NPC proteins expression in human full term placenta and to evaluate if their placental expression is modulated in placenta of obese and GDM women compared to normal weight women.

## 2.6 Materials and Methods

### 2.6.1 Subjects

Subjects were recruited at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM-Hôpital St Luc, Montréal QC, Canada) or at the Clinique Fidès (Montréal, QC, Canada) before the 10th week of their pregnancy. Each subject, who gave his informed consent to volunteer to this study, was interviewed and completed a form on their medical history, socio-demographic informations and life habits (drinking, smoking, used of drugs). Twenty-three women were chosen according to the inclusion criteria : caucasian, vaginal delivery, no alcohol during the pregnancy, no other complications during pregnancy, no fetal abnormality and no pathology. They were divided in three categories based on their BMI before the pregnancy : obese women with a BMI greater or equal to 30 kg/m<sup>2</sup>, normal weight women with a BMI between 18.5 and 24.9 kg/m<sup>2</sup>, and insulin treated women GDM, according to the criteria of the WHO [1, 2].

### 2.6.2 Blood and tissue samples

Blood samples of the mother and the umbilical cord as well as placenta samples were collected in order to perform lipid dosage and to measure gene and protein expressions of targeted proteins. Blood samples were collected at different timepoints during the three trimesters of pregnancy (1st : 10 at 17 weeks, 2nd : 22 at 28 weeks , 3rd : 36 at 42 weeks) as well as in the umbilical cord. Blood samples were centrifugated at 3500 x g during 15 minutes to obtain serum that was frozen at -20°C. Upon delivery, placentas were collected in DMEM medium (Dulbecco Modifies Eagle Medium,

Sigma) supplemented with antibiotics (0.12 mg/mL penicillin, 5 µg/mL amphotericin, 50 µg/mL gentamicin) and sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub> (90 mg/mL)). Villous tissue were kept, cut in small pieces of 5 cm<sup>2</sup> and frozen at -80°C.

### 2.6.3 Blood lipid dosage

Lipid dosage was performed in the maternal and umbilical cord samples. Plasma concentrations of cholesterol (CHOL), triacylglycerol (TG), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) as well as apolipoprotein (ApoA1 and ApoB100) were measured at hôpital Saint-François d'Assise in the biochimic clinical service (Québec, QC, Canada) using the Unicel 36 DX600 Synchron clinical system (Beckman-Coulter). Free fatty acid levels were measured using Free Fatty Acid Half micro test (Roche Diagnostics) according to the manufacturer instructions.

### 2.6.4 Real Time RT-PCR

RNA was extracted from placental tissue of normal weight (n = 8) and obese (n = 9) women using the extraction kit High pure RNA tissue kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer instructions. The Nanodrop2000 (Thermo Scientific) was used in order to evaluate the purity of the RNA extract and establish RNA concentration. After that, a reverse transcription (RT) was realized to convert 500 ng of RNA into cDNA for the quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) using Sigma Aldrich protocol (M-MLV Reverse Transcriptase and Buffer for cDNA synthesis (Sigma Aldrich)) and oligodT primers (1-5 µg, Roche Diagnostics). qRT-PCR was performed using Light 480 SYBRGreen master kit (Roche diagnostics) and

the Light Cycle 480 (Roche diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Forward and reverse primers (10 mM, Biobasic) of targeted genes were designed using Primerblast. Primers of housekeeping genes used were chosen according to Lanoix et al. (2012) where they demonstrated that those housekeeping genes were the most suitable for placental studies [37]. Standards curves were performed for housekeeping genes (*HPRT1*, *TOP1* and *PPIA*)[37] and targeted genes (*NPC1*, *NPC2*, and *NPC1LI*). A negative control using H<sub>2</sub>O and SYBR mix was used for each reaction. Each reaction was performed in duplicate. Melting curves were performed at the end of each amplification. The size and purity of PCR products were verified on 2% agarose gel. A geometrical mean was calculated with resulting ratios of the target gene expression normalized to the expression of each reference gene.

**Table 2.1      Primers used for qRT-PCR**

Gene	Primers (5'→3')		Reference
	Forward	Reverse	
<i>TOP1</i>	GGCAGAGTGAATCTAAGG	CTTAAAGGGTACAGGAATG	[37]
<i>PPIA</i>	GTTTGCAGACAAGGTCCCA	ACCCGTATGCTTAGGATG	
<i>HPRT1</i>	GACCAGTCAACAGGGGACATAA	AAGCTTGCGACCTTGACC	
<i>NPC1</i>	AGCCAGTAATGTCACCGAAAC	CCGAGGTTGAAGATAGTGTCG	-
<i>NPC2</i>	CAAAGGACAGTCTTACAGCGT	GGATAGGGCAGTTAATTCCACTC	-
<i>NPC1LI</i>	CTGGTATCACTGGAAGCGAGT	CACGCGGGTCACATTGATGA	-

### 2.6.5 Total protein extraction

In order to quantify placental protein, 750 to 800 mg of placental tissue from 8 obese women, 8 normal weight women and 6 women with GDM was homogenized with a Polytron tissue homogenizer PT3000 (Brinkmann, Canada) in a hypertonic buffer (125 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4% [v/v] Triton X-100, pH 8.0) containing anti proteases without EDTA (Complete mini-EDTA-free antiprotease cocktail) (Roche Diagnostics) and sodium orthovanadate. The resulting homogenate was then incubated during 30 min on ice before being centrifugated at 10 000 x g during 25 min at 4°C. The resulting supernatants were collected then aliquoted and frozen at -80°C for further experiments.

### 2.6.6 Western blot analyses

Protein assay for Western blot analyses was realized with a BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology) following the manufacturer's instructions. One hundred fifty µg of placental proteins were diluted with sample buffer 1x (Tris 1 M pH 6.8, SDS 12%, Glycerol 30%, H<sub>2</sub>O, bromophenol blue 0.05%, 10% β-mercaptoéthanol) then were heated at 95°C during 5 min. The denaturated samples were resolved on SDS-PAGE according to the targeted protein molecular weight then were electroblotted to polyvinylidene difluoride (PVDF) (Millipore) using a transblot (Millipore). Membranes were blocked with 5% milk in TBS-Tween (Tris-Buffered Saline-Tween) 0.1% (20 mM Tris Base, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) at room temperature during 1 hour. PVDF membranes were then incubated with primary antibodies diluted in 5% milk TBS-Tween 0.1% overnight at 4°C. Antibodies used were a rabbit anti-NPC1 (Novus Biologicals ; 1 :1000), a rabbit anti-NPC2 (Sigma ; 1 :2000) and a rabbit anti-NPC1L1 (Cayman Chemicals ; 1 : 500). Membranes were washed with TBS-T

0.1% three times during 10 min, then were incubated with anti-rabbit secondary antibodies (Cell signaling ; 1 : 10 000) during 1 hour at room temperature. Membranes were washed with TBS-T 0.1% during 5 min and was revealed with Luminata Forte, Western HRP Substrate (Milipore, USA). The Quantity one software (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, On, Canada) was used to quantify proteins. Amidoblack (Sigma Aldrich) staining was used for normalization previously described by Lanoix *et al.* (2012) [38].

#### 2.6.7 Statistical Analysis

Results were expressed by means  $\pm$  SEM and were analysed by PRISM software (GraphPad Software, La Jolla, Canada) using unpaired Student t-test or two-way anova when necessary. The results significance were tested using a p-value  $p < 0.05$ .

### 2.7 Results

#### 2.7.1 *Sociomedical parameters of normal weight, obese and GDM women*

Table 2.2 describes sociomedical parameters of normal weight, obese and GDM women and their new born. Even if there were no significant results except for the BMI, the obese and GDM women, placental weight tends to increase compared to normal weight women.

### 2.7.2 Lipid Dosage

The Figure 2.1 shows analyses of plasma cholesterol, LDL, HDL and TG in CTL, OB and GDM women at different times. Plasma cholesterol and HDL is significantly reduced in the third trimester of OB women compared to CTL women (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  respectively (Fig.2.1 a,b). Plasma HDL of OB women shows a significant decrease in the 2<sup>nd</sup> trimester compared to CTL (\* $p < 0.05$ ) (Fig.2.1 b). In GDM women, plasma HDL is significantly reduced in the 2<sup>nd</sup> and third trimesters (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  respectively) compared to CTL women (Fig.2.1 b). Furthermore, even if there is no significant differences, plasma TG in GDM women tends to increase in the third trimester compared to CTL and OB women (Fig.2.1 d).

The Figure 2.2 shows dosage of plasma FFA, plasma ApoA1 and plasma ApoB100 in CTL, OB and GDM women. Those results show significant diminution of plasma ApoA1 in the third trimester of OB women compared to CTL women (\* $p < 0.05$ ). Even if there was no significant differences, plasma FFA were increased in OB and GDM women as well as in the fetal venous cord blood compared to CTL women. Furthermore, ApoB100 and ApoA1 tend to increase over the time for CTL, OB and GDM women.

### 2.7.3 NPC mRNA and protein expression in human full term placenta

NPC1, NPC2 and NPC1L1 mRNA and proteins are all expressed in human full term placenta. There was no significant differences between our groups but tendencies are observed for placental protein expression (Fig. 2.3).

Relative NPC1 protein expression was 3 fold higher in OB and 3.5 fold GDM placenta compared to CTL women placentas (Fig. 2.3b). NPC2 protein expression tends to be



reduced (1.5) in placentas of OB women compared to CTL women placentas, but no differences were observed between relative NPC2 expression in GDM and CTL women placenta. Relative NPC1L1 protein expression tends to be reduced in placenta of GDM (1) and OB women (2.5) compared to CTL women placenta (5) (Fig. 2.3 d and f). Those results show the placental expression level of each protein : NPC1 protein seems to be the most expressed protein, followed by NPC2 and NPC1L1.

## 2.8 Discussion

Results showed modulation of lipid profile in OB and GDM women compared to CTL women. First, after statistical tests of sociomedical parameters, no significant differences were observed between our three groups. However, placental weight has a tendency to be heavier in GDM and OB women (Table 2.2). Those results are consistent with those supported by Dube et al. (2012 and 2013). They have previously shown significant differences with GDM and OB women's placenta heavier than CTL women placenta [21, 22]. This study had a bigger sample, which can explain the lack of significance between our groups.

Lipid dosage was realized for all groups in the three trimester in maternal blood and fetal venous cord blood (Fig 2.1 and 2.2). Statistical analyses showed increased lipid plasma levels with advanced gestational age for all groups. Evidence shows that lipid needs as energy source increase for mother's metabolism as well as proper fetus' development [16]. Stastical analysis showed a significant reduction of cholesterol, HDL (Fig 2.1 a,b) and ApoA1 levels in plasma of OB women (Fig 2.2b) but only significant reduction of HDL in GDM women (Fig. 2.1 b). No significant results have been observed between our groups regarding lipid dosage in venous cord blood. Nevertheless, Dubé et al. (2012 and 2013) have previously shown, significant

differences for LDL plasma levels. As a matter of fact, maternal LDL plasma levels were reduced in obese women whereas venous cord blood LDL levels were increased [21, 22]. They also showed increased levels of TG as well as reduced levels of HDL and ApoA1 in GDM women compared to normal weight women [21, 22]. Those results are in agreement with other studies which have also proved modulation of lipid maternal and fetal profile by metabolic diseases like GDM and OB [39-41]. For example, Hirschmugl et al. (2016) have also shown cholesterol level reduction and increased TG in obese women compared to normal weight women [39].

To gain more information, gene and protein expression of NPC family were analyzed in placental tissue of OB, GDM and CTL women. NPC family are cholesterol intracellular trafficking protein. They are known too mediate cholesterol intracellular trafficking in the liver, intestine and brain, but their expressions seem to be ubiquitous [28, 30, 31, 35]. Burke et al. (2009) have shown that NPC1 and NPC1L1 are expressed in hamster and human placenta [36]. Here, we have investigated placental expression of three members of NPC family : NPC1, NPC2 and NPC1L1 with quantitative RT-PCR for gene expression and Western blot for protein expression, in three groups (GDM, OB and CTL women). Results have confirmed NPC1 and NPC1L1 placental gene and protein expression and have demonstrated placental expression of NPC2 too (Fig. 2.3). No significant differences were observed in our groups for any protein or gene expression but trends are presents. NPC1 proteins levels tends to be higher in OB and GDM placenta compared to CTL women placenta. NPC2 protein levels were reduced in OB placenta compared to CTL women placenta but no trends were observable in GDM women placenta. Finally, NPC1L1 protein levels tends to be reduced in OB and GDM women placenta. The lack of significance can be explained by the small samples and the significant variance between each group. Other experiments have to be performed to establish a real link between NPC expressions and metabolic diseases. Nevertheless, obesity and GDM seem to modulate NPC proteins expressions and consequently, cholesterol intracellular trafficking. Previous

studies have demonstrated modulations of NPC proteins expression by metabolic diseases. Burke et al. (2009) have shown that hypercholesterolemic hamster have reduced NPC1 placental levels than control whereas they showed increased NPC1L1 placental levels [36]. However, this is not what we observed here, but GDM and OB women here are not hypercholesterolemic as we can see in blood lipid dosage. Genome wide association studies (GWAS) have shown associations between weight gain, obesity, type 2 diabetes with NPC1 polymorphisms [42-46]. Other studies revealed a link between insulin resistance and NPC expressions. Nomura et al. (2009) have used NPC1L1 inhibitor ezetimibe to repress NPC1L1 expression and they showed insulin resistance improvement in hepatocytes. It is believed that NPC1L1 mediated hepatic cholesterol absorption can cause, if overstimulated, ROS (reactive oxygen species) generation and consequently oxydative stress which cause insulin resistance [47]. Insulin resistance is a pathologic feature of obesity and GDM. However, NPC1L1 protein levels in OB and GDM women placenta were not increased but they were reduced compared to CTL women. This can be explained by other key regulatory mechanisms involved in cholesterol metabolism which are modulated in OB and GDM placenta. Moreover, placental protein expression are different than other tissues. A second study using NPC1L1 inhibitor ezetimibe have also shown increased HDL metabolism in type 2 diabetes subjects [48]. Tomkin et al. (2008), demonstrated increased levels of NPC1L1 proteins, oxydized-LDL (LDL-ox) and reduced levels of LDL in type 2 diabetes subjects intestines [49], which is in agreement with Yagy et al. (2012) [48]. Using mouse with Niemann Pick C disease model, Ong et al. (2012) have reported significant reduced levels of IRS1 and IRS2 (insulin receptor substrate 1 and 2) NPC mice's brains. IRS1 and IRS2 are key proteins of insulin signaling which was impaired in those models [50]. Vainio et al. (2005) have also shown in NPC mice an overexpression of IR (insulin receptor) but there was no insulin signalling activation. The IR overexpression seemed to compensate for the lack of IR activation [51]. In NPC disease, the NPC1 variant which is responsible for 95% case of diseases is named I1061T. A study of Praggastis et al. (2015) have created a mouse model with

I1061T NPC1 variant and have investigated pathologic features caused by this NPC1 variant. They showed neuronal and hepatic impairment as well as cholesterol accumulation and activation of pro-inflammatory cytokine [52]. Overstimulation of pro-inflammatory cytokine is one of the causes to the development of insulin resistance and obesity [53, 54]. A study using adipocyte cell line 3T3-L1, Fletcher et al. (2014) have show after inhibiting NPC1 expression, a reduction in IR and IRS1 expression and a reduced phosphorylation of Akt, which is a key molecule of insulin signalling [55]. Those papers reveal an interaction between the repression of NPC1 expression and the development of insulin resistance. However, this is not in agreement with our results. Indeed, NPC1 protein levels tend to be higher in OB and GDM women placenta compared to CTL women placenta. A study realized in white adipose tissue have shown the same results [56]. They found in adipocyte of white adipose tissue of obese men and women increased levels of NPC1 mRNA and protein [56]. Moreover, NPC proteins are regulated by key proteins which are involved in the development of insulin resistance and obesity, Yu et al. (2012) have shown in macrophage THP-1 that LDL-ox increase NPC1 protein levels which is mediated by Erk1/2/Cox2 pathway [57]. In the pathology of insulin resistance, the MAPK (Map kinases) pathway in particular Erk1/2 is overstimulated [58]. Liao et al. (2015) have studied NPC2 expression in HCC cells (hepatocellular carcinoma). They showed that NPC2 protein expression is repressed in HCC cells. After inducing NPC2 expression in those cells, they demonstrated that the MAPK Erk1/2 is inhibited [59]. Here, obese women placenta show reduced levels of NPC2 compared to normal weight women. It is in agreement with the increased activity of Erk1/2 kinase in obese subjects [58].

Those studies allows us to conclude that there is an association between the development of insulin resistance and NPC proteins expressions in the placenta. NPC1 protein levels were increased in obese and GDM women placenta whereas NPC2 and NPC1L1 proteins levels were reduced. A number of experiments have to be conducted to understand the possible mecanism involved. Furthermore, the exact funtion of NPC

proteins have to be experimented. In future studies, the use of a choriocarcinome cell line BeWo can be used to evaluate if NPC proteins if those cells express these proteins. Nevertheless, the use of primary CT would be the best way to evaluate the functions of NPC proteins in the human placenta. Regulatory mechanisms involved in NPC placental protein expressions have to be performed to understand how obesity and GDM modulate cholesterol transport across the placenta. It is important to understand how key proteins are affected in obesity and GDM to understand how obesity and GDM predispose those children to develop cardiovascular diseases and metabolic diseases mentioned before.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 2.1      Maternal plasma and newborn venous cord blood lipid profiles of CTL (18.5 < BMI < 24.9 kg/m<sup>2</sup>), OB (BMI> 30 kg/m<sup>2</sup>) and GDM BMI women.** Results are expressed by means  $\pm$  SD. Data were analyzed by two-way ANOVA tests (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001). HDL : High density lipoprotein ; LDL : Low density lipoprotein ; TG : Triglycerid ; CTL : normal weigh women (n=8) ; OB : obese women (n=9); GDM: gestational diabetes mellitus women (n=6) ; 1,2,3 : 1st trimester, 2<sup>nd</sup> trimester and 3rd trimester of pregnancy ; V.C.B : venous cord blood.

**Figure 2.2      Maternal plasma and newborn venous cord blood lipid profiles of CTL (18.5 < BMI < 24.9 kg/m<sup>2</sup>), OB (BMI> 30 kg/m<sup>2</sup>) and GDM women.** Results are expressed by means  $\pm$  SD. Data were analyzed by two-way ANOVA tests ( \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001). No data were obtained for plasma FFA on 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> trimester. FFA : Free Fatty Acid ; ApoA1 : apolipoprotein A1 ; ApoB100 : apolipoprotein B100 ; CTL : normal weigh women ; OB : obese women ; GDM : gestational diabetes mellitus women 1,2,3 : 1st trimester, 2<sup>nd</sup> trimester and 3rd trimester of pregnancy ; V.C.B : venous cord blood.

**Figure 2.3      Niemann Pick C mRNA and protein expression in human full-term placenta of CTL (18.5 < BMI < 24.9 kg/m<sup>2</sup>), OB (BMI> 30 kg/m<sup>2</sup>) and GDM women.** Placental mRNA expression of NPC1, NPC2 and NPC1L1 were calculated by real time RT-PCR and levels of expression were evaluated after normalizing with

*three housekeeping genes HPRT1, TOP1 and PPIA. Results are expressed as geometric means  $\pm$  SD. Evaluation of proteins levels of NPC1, NPC2 and NPC1L1 were performed in human full term placenta of normal weight and obese women after a normalization with amidoblack staining. Data were analyzed by Student test for mRNA expression and one-way ANOVA for protein expression. NPC1 : Niemann Pick C type 1 ; NPC2 : Niemann Pick C type II ; NPC1L1 : Niemann Pick C 1 like 1 ; CTL : normal weight women ; OB : obese women. ; GDM : gestational mellitus diabete women (a, c and d) : CTL n=3 OB n=3 ; (b and c) : CTL : n=8 ; OB n=9 ; GDM n=6.*

**Table 2.2 Sociomedical parameters of CTL (18.5 < BMI < 24.9 kg/m<sup>2</sup>) OB (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) and GDM women.** Results are expressed as means  $\pm$  SD. Data were analyzed by one-way ANOVA-tests were used ( $***p < 0.001$ ).  $n = 8$  for normal weight women and  $n = 9$  for obese women (CTL : normal weight women; OB : obese women ; GDM : gestational diabete mellitus).

Parameters	CTL	OB	GDM
n	8	9	6
<b>Women</b>			
<b>Weight gain (kg)</b>	13.24 $\pm$ 1.6	12.3 $\pm$ 4.03	15.75 $\pm$ 3.8
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>) before pregnancy</b>	21.64 $\pm$ 1.38	<b>33.75 <math>\pm</math> 3.48</b> ***	21.12 $\pm$ 1.3
<b>Gestational(weeks)</b>	39.13 $\pm$ 1.55	38.78 $\pm$ 1.48	39.3 $\pm$ 1.2
<b>Newborn</b>			
<b>Birth lenght (cm)</b>	51.81 $\pm$ 2.21	51.56 $\pm$ 2.07	52.33 $\pm$ 2.48
<b>Birth weight (g)</b>	3379.38 $\pm$ 709.80	3524.11 $\pm$ 511.48	3648.7 $\pm$ 489.36
<b>Placental weight (g)</b>	519.38 $\pm$ 122.63	712.22 $\pm$ 192.84	701.67 $\pm$ 197.02



## 2.9 References

1. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee.* World Health Organ Tech Rep Ser, 1995. **854**: p. 1-452.
2. *Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies.* Lancet, 2004. **363**(9403): p. 157-63.
3. Nelson, S.M., P. Matthews, and L. Poston, *Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome.* Hum Reprod Update, 2010. **16**(3): p. 255-75.
4. Arabin, B. and J.H. Stupin, *Overweight and Obesity before, during and after Pregnancy: Part 2: Evidence-based Risk Factors and Interventions.* Geburtshilfe Frauenheilkd, 2014. **74**(7): p. 646-655.
5. Bari, M.F., et al., *Gestational diabetic transcriptomic profiling of microdissected human trophoblast.* J Endocrinol, 2016. **229**(1): p. 47-59.
6. Pasquali, R., et al., *Obesity and reproductive disorders in women.* Hum Reprod Update, 2003. **9**(4): p. 359-72.
7. Sewell, M.F., et al., *Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity.* Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(4): p. 1100-3.
8. Boney, C.M., et al., *Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus.* Pediatrics, 2005. **115**(3): p.290-6.
9. Stothard, K.J., et al., *Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis.* JAMA, 2009. **301**(6): p. 636-50.
10. Osmond, C. and D.J. Barker, *Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women.* Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 3**: p. 545-53.
11. Kaaja, R. and T. Ronnemaa, *Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring.* Rev Diabet Stud, 2008. **5**(4): p. 194-202.
12. Gude, N.M., et al., *Growth and function of the normal human placenta.* Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 397-407.
13. Redmer, D.A., J.M. Wallace, and L.P. Reynolds, *Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development.* Domest Anim Endocrinol, 2004. **27**(3): p. 199-217.
14. Red-Horse, K., et al., *Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface.* J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 744-54.

15. Larque, E., M. Ruiz-Palacios, and B. Koletzko, *Placental regulation of fetal nutrient supply*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013. **16**(3): p. 292-7.
16. Lager, S. and T.L. Powell, *Regulation of nutrient transport across the placenta*. J Pregnancy, 2012. **2012**: p. 179827.
17. Desforges, M. and C.P. Sibley, *Placental nutrient supply and fetal growth*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 377-90.
18. Brett, K.E., et al., *Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 16153-85.
19. Potter, J.M. and P.J. Nestel, *The hyperlipidemia of pregnancy in normal and complicated pregnancies*. Am J Obstet Gynecol, 1979. **133**(2): p. 165-70.
20. Salameh, W.A. and D.S. Mastrogiannis, *Maternal hyperlipidemia in pregnancy*. Clin Obstet Gynecol, 1994. **37**(1): p. 66-77.
21. Dube, E., et al., *Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta*. Biol Reprod, 2012. **87**(1): p. 14, 1-11.
22. Dube, E., M. Ethier-Chiasson, and J. Lafond, *Modulation of cholesterol transport by insulin-treated gestational diabetes mellitus in human full-term placenta*. Biol Reprod, 2013. **88**(1): p. 16.
23. Brett, K.E., et al., *Placenta nutrient transport-related gene expression: the impact of maternal obesity and excessive gestational weight gain*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016. **29**(9): p. 1399-405.
24. Pagan, A., et al., *Materno-fetal transfer of docosahexaenoic acid is impaired by gestational diabetes mellitus*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **305**(7): p. E826-33.
25. Yan, J., et al., *Molecular mechanism of recombinant liver fatty acid binding protein's antioxidant activity*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2445-54.
26. Go, G.W. and A. Mani, *Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis*. Yale J Biol Med, 2012. **85**(1): p. 19-28.
27. Kwiterovich, P.O., Jr., *The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review*. Am J Cardiol, 2000. **86**(12A): p. 5L-10L.
28. Yu, L., et al., *Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6616-24.
29. Altmann, S.W., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption*. Science, 2004. **303**(5661): p. 1201-4.
30. Klein, A., et al., *NPC2 is expressed in human and murine liver and secreted into bile: potential implications for body cholesterol homeostasis*. Hepatology, 2006. **43**(1): p. 126-33.
31. Yu, X.H., et al., *NPC1, intracellular cholesterol trafficking and atherosclerosis*. Clin Chim Acta, 2014. **429**: p. 69-75.
32. Du, X. and H. Yang, *Endosomal cholesterol trafficking: protein factors at a glance*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013. **45**(1): p. 11-7.
33. Pentchev, P.G., *Niemann-Pick C research from mouse to gene*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1685**(1-3): p. 3-7.

34. Pentchev, P.G., et al., *A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 8247-51.
35. Jia, L., J.L. Betters, and L. Yu, *Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 239-59.
36. Burke, K.T., et al., *Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden Syrian hamster*. J Lipid Res, 2009. **50**(6): p. 1146-55.
37. Lanoix, D., et al., *Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta*. Mol Biotechnol, 2012. **52**(3): p. 234-43.
38. Lanoix, D., et al., *Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark*. Placenta, 2012. **33**(3): p. 151-6.
39. Hirschmugl, B., et al., *Maternal obesity modulates intracellular lipid turnover in the human term placenta*. Int J Obes (Lond), 2016.
40. Cinelli, G., et al., *Influence of Maternal Obesity and Gestational Weight Gain on Maternal and Foetal Lipid Profile*. Nutrients, 2016. **8**(6).
41. Scifres, C.M., J.M. Catov, and H.N. Simhan, *The impact of maternal obesity and gestational weight gain on early and mid-pregnancy lipid profiles*. Obesity (Silver Spring), 2014. **22**(3): p. 932-8.
42. Luczynski, W., et al., *Polymorphism of the FTO Gene Influences Body Weight in Children with Type 1 Diabetes without Severe Obesity*. Int J Endocrinol, 2014. **2014**: p. 630712.
43. Garver, W.S., et al., *Differential Association of Niemann-Pick C1 Gene Polymorphisms with Maternal Prepregnancy Overweight and Gestational Diabetes*. J Diabetes Obes, 2015. **2**(1).
44. Mariman, E.C., et al., *Extreme obesity is associated with variation in genes related to the circadian rhythm of food intake and hypothalamic signaling*. Physiol Genomics, 2015. **47**(6): p. 225-31.
45. Meyre, D., et al., *Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 157-9.
46. Al-Daghri, N.M., et al., *Mammalian NPC1 genes may undergo positive selection and human polymorphisms associate with type 2 diabetes*. BMC Med, 2012. **10**: p. 140.
47. Nomura, M., et al., *Inhibition of hepatic Niemann-Pick C1-like 1 improves hepatic insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(5): p. E1030-8.
48. Yagyu, H., et al., *Ezetimibe, an inhibitor of Niemann-Pick C1-like 1 protein, decreases cholesteryl ester transfer protein in type 2 diabetes mellitus*. Endocr J, 2012. **59**(12): p. 1077-84.
49. Tomkin, G.H., *Targets for intervention in dyslipidemia in diabetes*. Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S241-8.

50. Ong, Q.R., et al., *Impaired insulin signaling in an animal model of Niemann-Pick Type C disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **424**(3): p. 482-7.
51. Vainio, S., et al., *Defective insulin receptor activation and altered lipid rafts in Niemann-Pick type C disease hepatocytes*. Biochem J, 2005. **391**(Pt 3): p. 465-72.
52. Praggastis, M., et al., *A murine Niemann-Pick C1 I1061T knock-in model recapitulates the pathological features of the most prevalent human disease allele*. J Neurosci, 2015. **35**(21): p. 8091-106.
53. Kang, Y.E., et al., *The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0154003.
54. Schmidt, F.M., et al., *Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121971.
55. Fletcher, R., et al., *The role of the Niemann-Pick disease, type C1 protein in adipocyte insulin action*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95598.
56. Bambace, C., et al., *NPC1 in human white adipose tissue and obesity*. BMC Endocr Disord, 2013. **13**: p. 5.
57. Yu, X., et al., *OxLDL up-regulates Niemann-Pick type C1 expression through ERK1/2/COX-2/PPARalpha-signaling pathway in macrophages*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012. **44**(2): p. 119-28.
58. Nandipati, K.C., S. Subramanian, and D.K. Agrawal, *Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance*. Mol Cell Biochem, 2016.
59. Liao, Y.J., et al., *Niemann-Pick type C2 protein regulates liver cancer progression via modulating ERK1/2 pathway: Clinicopathological correlations and therapeutical implications*. Int J Cancer, 2015. **137**(6): p. 1341-51.

## FIGURES

FIGURE 2.1

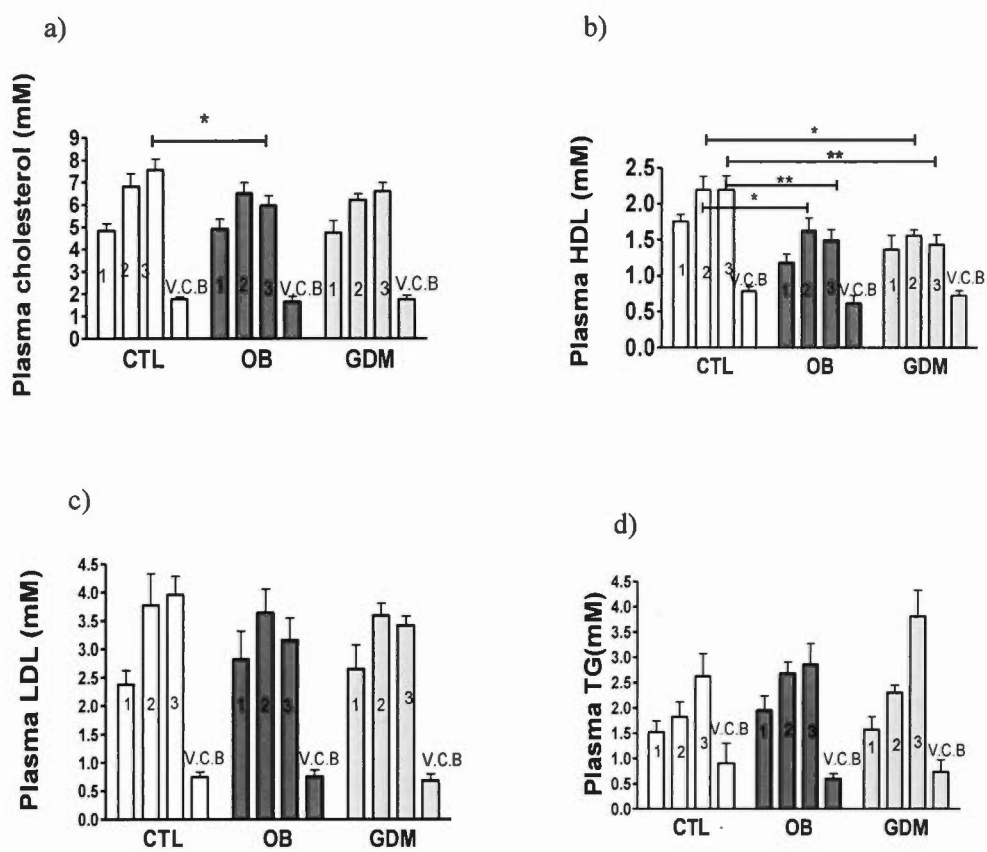


FIGURE 2.2

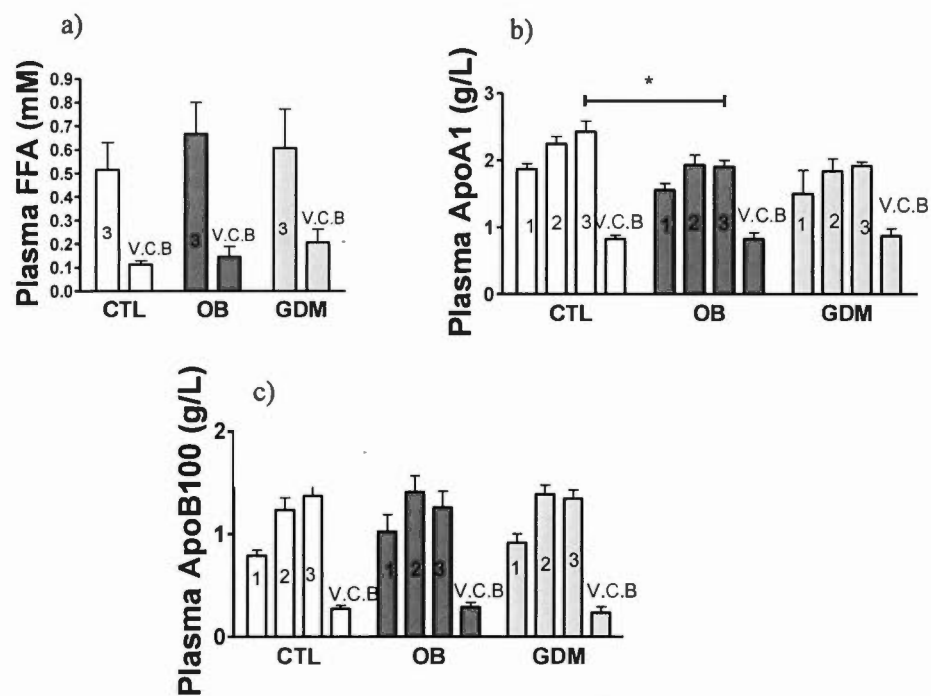
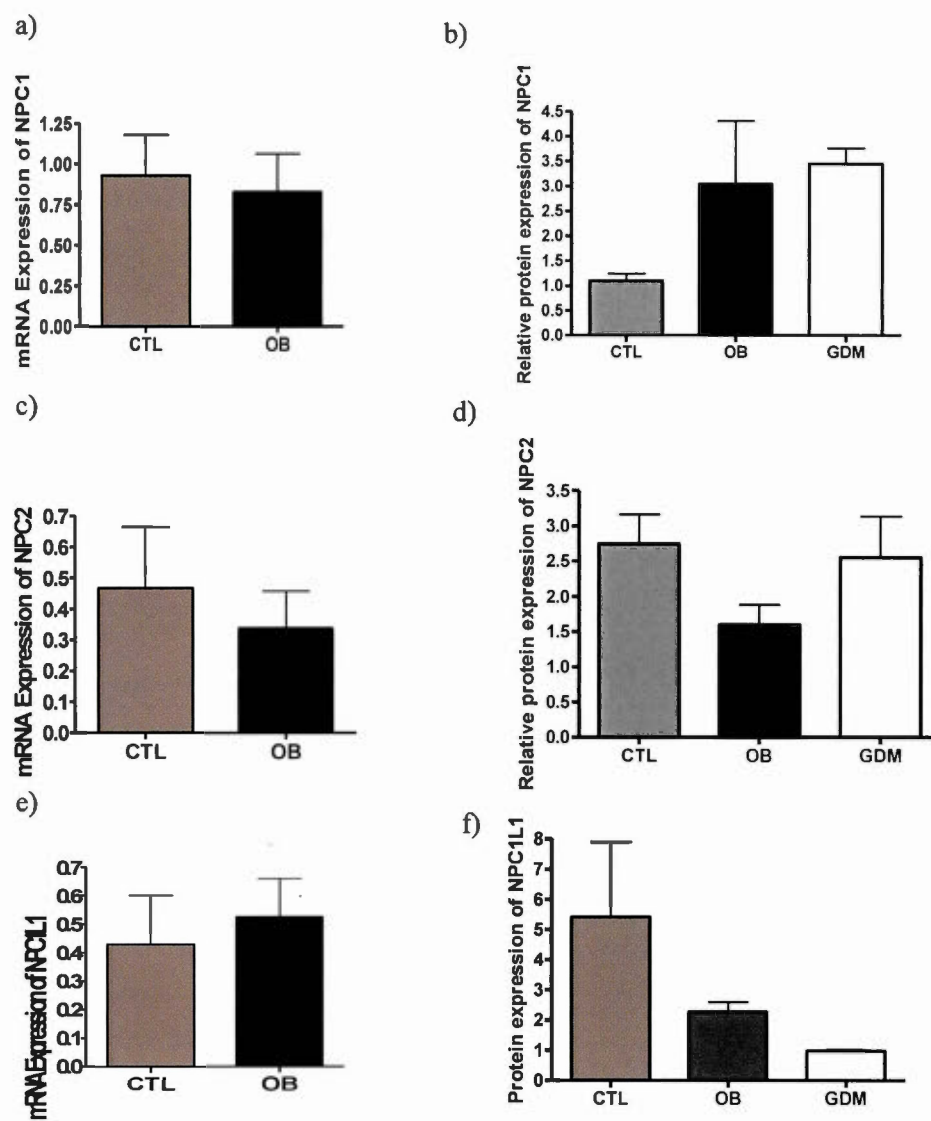


FIGURE 2.3



## CHAPITRE III

### DISCUSSION ET CONCLUSION

#### 3.1 DISCUSSION

Les résultats obtenus lors de ce projet de recherche permettent de mieux connaître l'impact des troubles métaboliques comme l'obésité et le diabète gestationnel sur les fonctions placentaires et indirectement le développement fœtal. Aujourd'hui, nous savons que l'obésité et le diabète gestationnel ont un impact considérable notamment sur le métabolisme lipidique [106, 107]. En effet, l'expression des protéines impliquées dans le transport et le métabolisme des lipides est grandement affectée. Ces perturbations pourraient être la cause du développement de maladies cardiovasculaires, de cancer, et autres maladies mortelles [4, 22]. Chez les femmes enceintes, l'obésité maternelle représente un facteur de risque de développer des complications graves comme la prééclampsie, le diabète gestationnel, le développement du diabète de type 2 chez l'enfant, des troubles cardiovasculaires graves, le développement du syndrome métabolique chez l'enfant, des troubles de reproduction etc. [4, 8, 108] C'est pourquoi le métabolisme et le transport des lipides dans le placenta sont étroitement étudiés afin de comprendre les mécanismes du développement de ces maladies.

Dans cette étude, nous avons en premier lieu analysé les données sociomédicales chez nos trois groupes : les femmes contrôles de poids normal ( $18.5 \text{ kg/m}^2 < \text{IMC} < 24.9 \text{ kg/m}^2$ ), des femmes atteintes d'obésité ( $\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$ ) et des femmes GDM et de poids normal (Tableau 2.2). Malgré le fait qu'on observe aucune



différence significative à part l'indice de masse corporel IMC ( $33.75 \pm 3.48$  in OB women versus  $21.64 \pm 1.38$  in CTL women), on peut voir que le poids du placenta des femmes atteintes d'obésité et celles atteintes du diabète gestationnel est plus élevé que celui des femmes de poids normal. Deux études précédentes réalisées par notre laboratoire ont montré une augmentation significative du poids du placenta chez les femmes atteintes d'obésité et de diabète gestationnel. En effet, étant donné que leur nombre d'échantillon est plus élevé que celui de cette présente étude, ceci pourrait expliquer l'absence de différence significative ici [25, 26].

Le dosage plasmatique des lipides et de protéines impliquées dans le métabolisme des lipides a été réalisé aux trois trimestres chez nos trois groupes ainsi que dans le sang du cordon ombilical (Figure 2.1 et 2.2). Après une analyse statistique, nous avons trouvé que les concentrations plasmatiques pour chaque dosage réalisé tendent à augmenter en fonction de la durée de gestation. Les lipides constituent une source d'énergie importante pour le développement du fœtus et la demande devient de plus en plus importante avec la gestation [17]. Les résultats montrent une réduction significative des niveaux de cholestérol, de lipoprotéines HDL et d'apolipoprotéines ApoA1 plasmatique chez les femmes obèses (Figure 2.1a et b et 2.2b)). De plus, les analyses statistiques ont montré une réduction significative des niveaux de lipoprotéines HDL chez les femmes GDM (Fig. 2.1 b) comparé aux femmes CTL. Aucun résultat significatif n'a été observé entre les groupes par rapport aux concentrations lipidiques dans le sang du cordon ombilical. Une étude précédente de notre laboratoire a montré une augmentation du niveau plasmatique de cholestérol dans le sang du cordon chez les femmes atteintes d'obésité. Dubé *et al.* (2012 et 2013) a montré aussi que les niveaux plasmatiques de LDL étaient réduits dans la circulation maternelle alors qu'ils étaient plus élevés dans le sang du cordon des enfants des femmes obèses [25, 26]. Une fois de plus, le nombre d'échantillon est un facteur important qui a certainement influencé les résultats. Une autre étude de notre laboratoire a montré une augmentation des concentrations de TG ainsi qu'une réduction

des niveaux de HDL et d'ApoA1 chez les femmes GDM comparés aux femmes de poids normal [25, 26]. Nos résultats sont en accord avec d'autres études montrant l'impact des troubles métaboliques comme l'obésité maternelle et le diabète gestationnel sur le profil lipidique maternel et fœtal [106, 109, 110]. Hirschmugl *et al.* (2016) ont eux aussi démontré une diminution des concentrations de cholestérol réduits dans leur groupe de femmes obèses. Ils ont aussi observé que les TG dans le placenta sont significativement plus élevés chez les femmes obèses que les femmes de poids normal [106]. De même, Solis-Paredes *et al.* (2016) ont observé que les concentrations de LDL-CHOL sont réduites chez leur groupe de femmes OB comparées au groupe contrôle, et que les concentrations de LDL-CHOL dans la circulation fœtale de femmes OB se retrouvaient élevées par rapport au contrôle [107].

Ensuite, nous avons voulu déterminer le niveau d'expression génique et protéique de la famille NPC. Ce sont des protéines de transport du cholestérol connue pour médier les transport du cholestérol intracellulaire via la voie endosomale et lysosomale particulièrement dans le foie, l'intestin et le cerveau [33, 74, 78, 80]. Toutefois leur expression dans le placenta humain est encore peu connue. Burke *et al.* (2009) ont montré l'expression de NPC1 et NPC1L1 dans le placenta de hamster et ont réalisé une expérience d'immunobuvardage de type Western dans le placenta humain [34]. C'est pour cette raison que nous avons réalisé une étude sur une plus grande cohorte pour déterminer l'expression génique et protéique des membres de la famille NPC, NPC1, NPC2 et NPC1L1. Les résultats ont été obtenus par RT-PCR en temps réel sur nos groupes de femmes contrôle et obèses. Par manque d'échantillons, l'expression génique dans nos échantillons de femmes GDM n'a pas été réalisé. Pour analyser l'expression protéique de NPC1, NPC2 et NPC1L1, nous avons utilisé la méthode d'immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps spécifique contre ces protéines. Les résultats obtenus se retrouve dans la figure 2.3. Les résultats confirment l'expression des gènes *NPC1* et *NPC1L1* ainsi que les protéines dans le placenta humain à termes tel que démontré dans une étude de Burke et al, 2009 [34].

De plus, nous avons démontré que le troisième membre de la famille de protéines des NPC, NPC2 est aussi exprimée au niveau protéique chez nos trois groupes d'échantillons. Les analyses statistiques n'ont pas montré de significativité entre nos groupes. Par contre, des tendances sont observables. Le niveau d'expression protéique de NPC1 a tendance à augmenter dans le placenta des femmes obèses et GDM par rapport aux CTL. L'absence de significativité peut être expliquée par la variance significative à l'intérieur du groupe (l'écart type est élevé) (Fig. 2.3a) et due à un nombre d'échantillon faible. Quant à l'expression de NPC2, on observe une diminution l'expression protéique placentaire dans notre groupe de femmes atteintes d'obésité comparé à nos femmes contrôles (Fig. 2.3 c). Au niveau de son expression génique, il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des groupes, mais on voit une tendance à la diminution de l'expression de l'ARNm de NPC2 chez nos groupes OB (Fig. 2.3b). Enfin, l'expression protéique de NPC1L1 a tendance à réduire chez les femmes GDM et OB comparé à notre groupe contrôle (Fig 2.3 e).

D'après les résultats obtenus, il est possible de conclure que les troubles métaboliques tel que l'obésité et le diabète gestationnel ont un impact sur l'expression de protéines clés impliquées dans le métabolisme du cholestérol, plus particulièrement de son transport intracellulaire. De nombreuses études ont précédemment démontré que l'expression de ces protéines sont modulées par des troubles du métabolisme lipidique. Tout d'abord, Burke *et al.* (2009) ont démontré que l'expression des protéines NPC1 et NPC1L1 est affectée dans le placenta de hamster qui ont subi une diète élevée en gras [34]. En effet, les hamster nourris avec un régime élevé en gras révèlent une diminution de l'expression protéique de NPC1 et une augmentation de l'expression de NPC1L1 [34]. Nos résultats sont différents de ceux de Burke *et al.* (2009) [34]. Nos femmes OB ne sont pas hypercholestérolémiques donc ceci pourrait expliquer pourquoi nos résultats sont différents de ceux de Burke *et al.* (2009). Néanmoins ces résultats montrent que les modifications des concentrations en cholestérol modifie l'expression de ces protéines dans le placenta de hamster. En plus,

de nombreuses études génomiques ont déterminé une association entre le développement de l'obésité, la prise de poids ou le diabète de type 2, avec le polymorphisme du gène NPC1 [100, 101, 111-113]. Nomura *et al.* (2009), ont découvert un lien entre la résistance à l'insuline et l'expression de NPC1L1. En effet, en utilisant un inhibiteur de NPC1L1 appelé ezetimibe, ils ont démontré une amélioration de la résistance à l'insuline dans des hépatocytes. NPC1L1 a pour rôle la réabsorption du cholestérol biliaire dans le foie. Une réabsorption du cholestérol trop importante due à une quelconque dérégulation métabolique augmenterait les concentrations de cholestérol intracellulaire. L'accumulation du cholestérol intracellulaire provoque un stress oxydatif causé par la génération de ROS (reactive oxygen species) [99]. Étant donné qu'un trait pathologique de l'obésité est la résistance à l'insuline due à une accumulation de tissu adipeux, on devrait d'après l'étude de Nomura *et al.*, observé une augmentation de l'expression protéique de NPC1L1. Cependant, ce n'est pas ce qu'on a obtenu comme résultats. Étant donné que l'expression de protéines clés dans le placenta est énormément affectée par l'obésité, il est possible que des protéines régulatrices de NPC1L1 étant affectées ait un autre effet sur l'expression placentaire de NPC1L1. De plus, il faut savoir que l'expression des protéines dans le placenta peut être totalement différente que dans tout autre tissu. Une autre étude sur l'utilisation de l'ezetimibe, inhibiteur de la protéine NPC1L1 a été réalisée sur des patients atteints de diabète de type 2 [114]. Les résultats ont démontré une amélioration du métabolisme des HDL et donc du transport du cholestérol inverse avec l'utilisation de l'ezetimibe [114]. Enfin, chez des patients diabétiques, il a été observé une augmentation de NPC1L1, des LDL oxydées et une diminution de LDL dans les intestins, ce qui confirme l'étude précédente [115]. Ong *et al.* (2012) ont quant à eux, démontré une perturbation de la signalisation de l'insuline chez des souris démontrant les traits pathologiques de Niemann Pick type C [116]. Ils ont montré dans cette étude que l'expression de IRS1 et IRS2 (respectivement insulin receptor substrate1 and 2) était réduite dans le cerveau des souris atteintes de la maladie NPC [116]. Vainio *et al.* (2005) ont eux aussi constaté un lien entre la signalisation de

l'insuline et la maladie Nieman Pick type C. En effet, chez un modèle de souris NPC, ils ont démontré une surexpression du récepteur d'insuline IR. Néanmoins, cette surexpression reflétait une compensation d'une perturbation au niveau de l'activation de IR, qui est un phénomène propre à la résistance à l'insuline observée dans le diabète de type 2 ainsi que dans l'obésité [97]. Une étude a été réalisée sur un modèle de souris NPC1 I1061T « knock in » par Praggastis *et al.* (2015). Ils ont créé un modèle de souris avec le variant du gène *NPC1* qui est le facteur principal du développement de la maladie NPC, variant communément appelé I1061T. Après une étude complète du modèle de souris, ils ont découvert que ce variant provoque plusieurs traits pathologiques de la maladie : troubles neurologique et hépatique caractéristiques de la maladie NPC. De plus, ce modèle de souris manifeste une accumulation de cholestérol ainsi qu'une activation de cytokines pro-inflammatoires [117]. L'activation de cytokines pro-inflammatoires est responsable du développement de la résistance à l'insuline, et de l'obésité [118, 119]. Il est important de prendre en compte toutes ces caractéristiques afin d'établir un lien concret entre l'obésité, le GDM et l'expression des protéines NPC. Jelinek *et al.* (2015) ont confirmé une interaction entre l'intolérance au glucose et le gène *NPC1* chez un modèle de souris C57BL/6J NPC1 nourris avec un régime élevé en gras. Ils ont démontré que par rapport au souris WT (wild type), les souris NPC1 (protéine NPC1 non fonctionnelle) sont plus sensibles au développement d'une intolérance au glucose lorsqu'elles sont nourries à une diète élevée en gras, et sont conséquemment sensibles au gain de poids, comparées aux WT [102]. Dans une lignée cellulaire 3T3-L1 d'adipocytes, Fletcher *et al.* (2014) ont inhibé l'expression génique de *NPC1* ainsi que la protéine afin de déterminer l'impact sur la signalisation à l'insuline. Les résultats ont démontré une réponse à l'insuline réduite due à une diminution de l'expression du récepteur IR et de son substrats IRS1 ainsi qu'une diminution de la phosphorylation d'Akt, et donc de l'activation d'Akt [98]. Ces nombreuses études démontrent qu'une répression de l'expression de NPC1 est associée à une résistance à l'insuline. Néanmoins nos résultats montrent une augmentation de l'expression protéique dans le placenta de femmes atteintes d'obésité et de GDM.

Bambace *et al.* (2013) ont eux aussi démontré dans les cellules adipeuses du tissu adipeux blanc une expression élevée de NPC1 au niveau génique et protéique chez des hommes et des femmes obèses comparés à leur contrôle [103]. Cette étude confirme nos résultats obtenus quant à l'augmentation de l'expression protéine de NPC1. Nos résultats permet de confirmer l'expression des protéines NPC dans le placenta humain. Néanmoins leur rôle dans le placenta n'est pas connu. Il serait intéressant dans une perspective future de déterminer si celles-ci sont exprimées dans une lignée cellulaire BeWo et de bloquer l'expression de NPC1 et NPC2 et de voir s'il y a une accumulation de cholestérol dans les lysosomes. A ce moment là, il serait intéressant de refaire la même manipulation mais avec des cellules CT primaires extraites de placenta. Une fois que le rôle de ces protéines a été déterminé, la régulation de l'expression de ces protéines pourra être analysée en réprimant l'expression de certains gènes régulateurs et d'observer l'impact sur le transport du cholestérol.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de l'expression des protéines NPC dans l'obésité, il est important de savoir comment ces protéines sont régulées. En premier lieu, étant donné que ces protéines ont pour rôle de transporter le cholestérol intracellulaire, leurs expressions est régulées par le contenu en stérol, et donc via la voie de signalisation de SREBP [120]. L'expression de NPC1 est diminuée lorsque les niveaux de cholestérol sont élevés dans le placenta par rétrocontrôle négatif [120], alors que l'expression de NPC1L1 est augmenté dans le placenta chez de hamsters atteints d'hypercholestérolémie à cause du gradient de concentration de cholestérol [34]. De plus, une étude sur la maladie Niemann Pick C, a montré que la protéine NPC1 mal repliée, non fonctionnelle observée dans cette maladie, est marquée par l'ubiquitine ligase pour une dégradation protéasomale. Cette dégradation est activée par la signalisation de Akt [93]. Une étude de notre laboratoire a précédemment démontré dans le placenta de femmes atteintes de diabète gestationnel de poids normal ainsi que dans le placenta de femmes atteintes de diabète gestationnel obèse une augmentation de l'expression protéique de LXR [26], qui est un des principal

régulateur positif de l'expression génique et protéique de NPC1 [33]. Nos résultats montrent aussi une augmentation de NPC1 dans le placenta des femmes atteintes d'obésité et de GDM, même si elle n'est pas significative. Dans des macrophages THP-1, Yu *et al.* (2012) ont démontré que la présence de LDL oxydées augmente l'expression de NPC1. Cette augmentation est médiée par une augmentation de l'expression de PPAR  $\alpha$  à travers la voie Erk1/2/COX2 [91]. Dans la résistance à l'insuline dans l'obésité, il est observé une augmentation de l'activité des kinases MAPK dont la kinase Erk1/2. La signalisation des MAPK est donc une des voies en cause de la résistance à l'insuline observée dans l'obésité [121]. Une autre étude en lien avec la voie de signalisation Erk1/2 et NPC2 a été réalisée dans le cadre du cancer du foie dans des cellules primaires HCC (hepatocellular carcinoma) [122]. Leurs expériences ont montré que la protéine NPC2 était réprimée dans les tumeurs du foie. Ils ont donc réalisé une surexpression de NPC2 dans leurs modèles cellulaires et ils ont montré que NPC2 inhibe la prolifération et la migration cellulaire. Cette action est médiée par une inhibition de l'activation des kinases MAPK, dont la kinase Erk1/2 [122]. Dans nos résultats, nous observons une diminution de l'expression protéique de NPC2 chez nos femmes obèses. Étant donné que l'activation des kinases MAPK chez les femmes obèses est très importante et fait partie des causes du développement d'une résistance à l'insuline, il est possible qu'il y ait une régulation à ce niveau là, dans le placenta [121].

### 3.2 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES

Les littératures nombreuses ont démontré qu'il existait un lien entre l'expression des protéines NPC avec la résistance à l'insuline, que ce soit au niveau de la signalisation de l'insuline via le récepteur IR et son substrat IRS1 et 2, ou bien au niveau des signalisations des MAPK qui régulent la signalisation à l'insuline. Ces

études appuient nos hypothèses sur le fait que les troubles métaboliques modulent le transport du cholestérol en agissant au niveau des transporteurs NPC intracellulaire. Comme notre laboratoire l'a précédemment démontré, l'obésité ainsi que le diabète gestationnel a un impact sur l'expression des protéines clés impliquées dans le métabolisme des lipides dans le placenta, et ici nous avons démontré de nouveaux transporteurs dont l'expression est dérégulée. Ce qui est étrange dans nos résultats d'immunobuvardage, est qu'on observe une augmentation de l'expression de NPC1 chez nos femmes OB et GDM, alors qu'une diminution de NPC2 est observée. Ces deux transporteurs colaborent pour exporter le cholestérol à l'extérieure des lysosomes afin qu'il soit utilisé par la cellule. Il est possible qu'un mécanisme de régulation puisse être impliqué afin de compenser l'augmentation significative de l'expression placentaire de NPC1. D'autres études restent encore à être réalisées afin de confirmer le rôle des protéines NPC dans le transport de cholestérol. En effet, notre laboratoire en collaboration avec d'autres chercheurs de notre centre de recherche, ainsi que d'autres laboratoires avons déjà démontré que le modèle de lignée cellulaire BeWo, qui est une lignée issue d'un choriocarcinome humain, est un bon modèle pour étudier le transport placentaire car elle exprime beaucoup de transporteurs clés du placenta, et elle exprime deux hormones clés du placenta humain, l'hormone hCG (hormone chorionique gonadotrope) et hPL (human placental lactogen) [123, 124].

Pour la continuité de ce projet, l'expression génique par PCR en temps réel ainsi que l'expression protéique par immunobuvardage de type Western des protéines NPC1, NPC2, et NPC1L1 doit être réalisée dans la lignée cellulaire BeWo, afin de déterminer si elle représente un bon modèle pour l'étude fonctionnelle des protéines NPC. Une fois que cela aura été établi, le transport du cholestérol intracellulaire pourra être étudié. En premier lieu, l'expression de NPC1 devra être réprimée à l'aide de petit ARN interférants (ARNsi) complémentaire à l'ARNm de NPC1 qui devront être transfectés dans les cellules BeWo. Après avoir déterminé les conditions nécessaires pour optimiser la répression génique, un immunobuvardage de type Western de nos extraits



protéiques tissulaires devra être effectué afin de confirmer l'absence de notre protéine dans nos cellules. Ensuite, étant donné que cette protéine permet l'efflux du cholestérol à l'extérieur des lysosomes et que son absence provoque une accumulation du cholestérol dans la cellule, un test de coloration à la filipin peut être réalisé. Ce test a été utilisé afin de confirmer l'accumulation de cholestérol non estérifié dans des fibroblastes caractéristiques de maladie NPC (absence de protéines fonctionnelles). Après visualisation par microscopie en fluorescence, il en résulte une accumulation de cholestérol non estérifié visible dans les endosomes tardifs et lysosomes [125]. Une fois, qu'on a déterminé que la répression de NPC1 provoque une accumulation de cholestérol non estérifié dans les endosomes et lysosomes, on peut réaliser la même expérience avec NPC2, qui se retrouve soluble dans la lumière endosomale et lysosomale. NPC1L1 est une protéine transmembranaire qui se retrouve exprimée au niveau des membrane à villosités des entérocytes, ainsi qu'au niveau des membranes cellulaires des hépatocytes. Il serait alors intéressant de déterminer si NPC1L1 est exprimée au niveau de la membrane MVM du syncytiotrophoblaste, en isolant des cytotrophoblastes de placenta humain à terme, et en purifiant les protéines des membranes MVM du placenta [25]. Enfin, étant donné qu'il existe une interaction entre la résistance à l'insuline et l'expression des protéines NPC, l'étude des mécanismes régulateurs impliqués dans l'expression de NPC1 et le lien avec la régulation de la signalisation à l'insuline, pourrait offrir une nouvelle vision au regard de l'obésité maternelle et du diabète gestationnel au monde de la science biomédicale.

## BIBLIOGRAPHIE

1. *PHYSICAL STATUS: THE USE AND INTERPRETATION OF ANTHROPOMETRY. REPORT OF A WHO EXPERT COMMITTEE.* WORLD HEALTH ORGAN TECH REP SER, 1995. **854**: P. 1-452.
2. *APPROPRIATE BODY-MASS INDEX FOR ASIAN POPULATIONS AND ITS IMPLICATIONS FOR POLICY AND INTERVENTION STRATEGIES.* LANCET, 2004. **363**(9403): P. 157-63.
3. NELSON, S.M., P. MATTHEWS, AND L. POSTON, *MATERNAL METABOLISM AND OBESITY: MODIFIABLE DETERMINANTS OF PREGNANCY OUTCOME.* HUM REPROD UPDATE, 2010. **16**(3): P. 255-75.
4. ARABIN, B. AND J.H. STUPIN, *OVERWEIGHT AND OBESITY BEFORE, DURING AND AFTER PREGNANCY: PART 2: EVIDENCE-BASED RISK FACTORS AND INTERVENTIONS.* GEBURTSHILFE FRAUENHEILKD, 2014. **74**(7): P. 646-655.
5. PASQUALI, R., ET AL., *OBESITY AND REPRODUCTIVE DISORDERS IN WOMEN.* HUM REPROD UPDATE, 2003. **9**(4): P. 359-72.
6. BARI, M.F., ET AL., *GESTATIONAL DIABETIC TRANSCRIPTOMIC PROFILING OF MICRODISSECTED HUMAN TROPHOBLAST.* J ENDOCRINOL, 2016. **229**(1): P. 47-59.
7. STOTHARD, K.J., ET AL., *MATERNAL OVERWEIGHT AND OBESITY AND THE RISK OF CONGENITAL ANOMALIES: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS.* JAMA, 2009. **301**(6): P. 636-50.
8. BONEY, C.M., ET AL., *METABOLIC SYNDROME IN CHILDHOOD: ASSOCIATION WITH BIRTH WEIGHT, MATERNAL OBESITY, AND GESTATIONAL DIABETES MELLITUS.* PEDIATRICS, 2005. **115**(3): P. E290-6.
9. SEWELL, M.F., ET AL., *INCREASED NEONATAL FAT MASS, NOT LEAN BODY MASS, IS ASSOCIATED WITH MATERNAL OBESITY.* AM J OBSTET GYNECOL, 2006. **195**(4): P. 1100-3.
10. OSMOND, C. AND D.J. BARKER, *FETAL, INFANT, AND CHILDHOOD GROWTH ARE PREDICTORS OF CORONARY HEART DISEASE, DIABETES, AND HYPERTENSION IN ADULT MEN AND WOMEN.* ENVIRON HEALTH PERSPECT, 2000. **108** SUPPL 3: P. 545-53.
11. JOHANSSON, S., ET AL., *MATERNAL OVERWEIGHT AND OBESITY IN EARLY PREGNANCY AND RISK OF INFANT MORTALITY: A POPULATION BASED COHORT STUDY IN SWEDEN.* BMJ, 2014. **349**: P. G6572.
12. KAAJA, R. AND T. RONNEMAA, *GESTATIONAL DIABETES: PATHOGENESIS AND CONSEQUENCES TO MOTHER AND OFFSPRING.* REV DIABET STUD, 2008. **5**(4): P. 194-202.

13. GUDE, N.M., ET AL., *GROWTH AND FUNCTION OF THE NORMAL HUMAN PLACENTA*. THROMB RES, 2004. **114**(5-6): P. 397-407.
14. RED-HORSE, K., ET AL., *TROPHOBLAST DIFFERENTIATION DURING EMBRYO IMPLANTATION AND FORMATION OF THE MATERNAL-FETAL INTERFACE*. J CLIN INVEST, 2004. **114**(6): P. 744-54.
15. REDMER, D.A., J.M. WALLACE, AND L.P. REYNOLDS, *EFFECT OF NUTRIENT INTAKE DURING PREGNANCY ON FETAL AND PLACENTAL GROWTH AND VASCULAR DEVELOPMENT*. DOMEST ANIM ENDOCRINOL, 2004. **27**(3): P. 199-217.
16. LARQUE, E., M. RUIZ-PALACIOS, AND B. KOLETZKO, *PLACENTAL REGULATION OF FETAL NUTRIENT SUPPLY*. CURR OPIN CLIN NUTR METAB CARE, 2013. **16**(3): P. 292-7.
17. LAGER, S. AND T.L. POWELL, *REGULATION OF NUTRIENT TRANSPORT ACROSS THE PLACENTA*. J PREGNANCY, 2012. **2012**: P. 179827.
18. DESFORGES, M. AND C.P. SIBLEY, *PLACENTAL NUTRIENT SUPPLY AND FETAL GROWTH*. INT J DEV BIOL, 2010. **54**(2-3): P. 377-90.
19. CETIN, I., ET AL., *MATERNAL AND FETAL AMINO ACID CONCENTRATIONS IN NORMAL PREGNANCIES AND IN PREGNANCIES WITH GESTATIONAL DIABETES MELLITUS*. AM J OBSTET GYNECOL, 2005. **192**(2): P. 610-7.
20. OSMOND, D.T., ET AL., *PLACENTAL GLUCOSE TRANSPORT AND UTILISATION IS ALTERED AT TERM IN INSULIN-TREATED, GESTATIONAL-DIABETIC PATIENTS*. DIABETOLOGIA, 2001. **44**(9): P. 1133-9.
21. JANSSON, T., ET AL., *ALTERATIONS IN THE ACTIVITY OF PLACENTAL AMINO ACID TRANSPORTERS IN PREGNANCIES COMPLICATED BY DIABETES*. DIABETES, 2002. **51**(7): P. 2214-9.
22. BRETT, K.E., ET AL., *MATERNAL-FETAL NUTRIENT TRANSPORT IN PREGNANCY PATHOLOGIES: THE ROLE OF THE PLACENTA*. INT J MOL SCI, 2014. **15**(9): P. 16153-85.
23. GUIBOURDENCHE, J., ET AL., *DEVELOPMENT AND HORMONAL FUNCTIONS OF THE HUMAN PLACENTA*. FOLIA HISTOCHEM CYTOBIOL, 2009. **47**(5): P. S35-40.
24. BELKACEMI, L., ET AL., *CALCIUM CHANNELS, TRANSPORTERS AND EXCHANGERS IN PLACENTA: A REVIEW*. CELL CALCIUM, 2005. **37**(1): P. 1-8.
25. DUBE, E., ET AL., *MODULATION OF FATTY ACID TRANSPORT AND METABOLISM BY MATERNAL OBESITY IN THE HUMAN FULL-TERM PLACENTA*. BIOL REPROD, 2012. **87**(1): P. 14, 1-11.
26. DUBE, E., M. ETHIER-CHIASSE, AND J. LAFOND, *MODULATION OF CHOLESTEROL TRANSPORT BY INSULIN-TREATED GESTATIONAL*

- DIABETES MELLITUS IN HUMAN FULL-TERM PLACENTA*. BIOL REPROD, 2013. **88**(1): P. 16.
27. BRETT, K.E., ET AL., *PLACENTA NUTRIENT TRANSPORT-RELATED GENE EXPRESSION: THE IMPACT OF MATERNAL OBESITY AND EXCESSIVE GESTATIONAL WEIGHT GAIN*. J MATERN FETAL NEONATAL MED, 2016. **29**(9): P. 1399-405.
  28. PAGAN, A., ET AL., *MATerno-FETAL TRANSFER OF DOCOSAHEXAENOIC ACID IS IMPAIRED BY GESTATIONAL DIABETES MELLITUS*. AM J PHYSIOL ENDOCRINOL METAB, 2013. **305**(7): P. E826-33.
  29. YAN, J., ET AL., *MOLECULAR MECHANISM OF RECOMBINANT LIVER FATTY ACID BINDING PROTEIN'S ANTIOXIDANT ACTIVITY*. J LIPID RES, 2009. **50**(12): P. 2445-54.
  30. SALAMEH, W.A. AND D.S. MASTROGIANNIS, *MATERNAL HYPERLIPIDEMIA IN PREGNANCY*. CLIN OBSTET GYNECOL, 1994. **37**(1): P. 66-77.
  31. POTTER, J.M. AND P.J. NESTEL, *THE HYPERLIPIDEMIA OF PREGNANCY IN NORMAL AND COMPLICATED PREGNANCIES*. AM J OBSTET GYNECOL, 1979. **133**(2): P. 165-70.
  32. VANIER, M.T., *NIEMANN-PICK DISEASE TYPE C*. ORPHANET J RARE DIS, 2010. **5**: P. 16.
  33. YU, X.H., ET AL., *NPC1, INTRACELLULAR CHOLESTEROL TRAFFICKING AND ATHEROSCLEROSIS*. CLIN CHIM ACTA, 2014. **429**: P. 69-75.
  34. BURKE, K.T., ET AL., *TRANSPORT OF MATERNAL CHOLESTEROL TO THE FETUS IS AFFECTED BY MATERNAL PLASMA CHOLESTEROL CONCENTRATIONS IN THE GOLDEN SYRIAN HAMSTER*. J LIPID RES, 2009. **50**(6): P. 1146-55.
  35. COSTA, M.A., *THE ENDOCRINE FUNCTION OF HUMAN PLACENTA: AN OVERVIEW*. REPROD BIOMED ONLINE, 2016. **32**(1): P. 14-43.
  36. TUCKEY, R.C., *PROGESTERONE SYNTHESIS BY THE HUMAN PLACENTA*. PLACENTA, 2005. **26**(4): P. 273-81.
  37. COLE, L.A., *BIOLOGICAL FUNCTIONS OF HCG AND HCG-RELATED MOLECULES*. REPROD BIOL ENDOCRINOL, 2010. **8**: P. 102.
  38. COYA, R., ET AL., *PROGESTERONE AND HUMAN PLACENTAL LACTOGEN INHIBIT LEPTIN SECRETION ON CULTURED TROPHOBLAST CELLS FROM HUMAN PLACENTAS AT TERM*. GYNECOL ENDOCRINOL, 2005. **21**(1): P. 27-32.
  39. HARDIE, L., ET AL., *CIRCULATING LEPTIN IN WOMEN: A LONGITUDINAL STUDY IN THE MENSTRUAL CYCLE AND DURING PREGNANCY*. CLIN ENDOCRINOL (OXF), 1997. **47**(1): P. 101-6.
  40. HANDWERGER, S. AND M. FREEMARK, *THE ROLES OF PLACENTAL GROWTH HORMONE AND PLACENTAL LACTOGEN IN THE*

- REGULATION OF HUMAN FETAL GROWTH AND DEVELOPMENT. J PEDIATR ENDOCRINOL METAB*, 2000. **13**(4): P. 343-56.
41. WOOLLETT, L.A., *REVIEW: TRANSPORT OF MATERNAL CHOLESTEROL TO THE FETAL CIRCULATION. PLACENTA*, 2011. **32** SUPPL 2: P. S218-21.
  42. LAFOND, J., ET AL., *PARATHYROID HORMONE RECEPTOR IN HUMAN PLACENTAL SYNCYTIOTROPHOBLAST BRUSH BORDER AND BASAL PLASMA MEMBRANES. ENDOCRINOLOGY*, 1988. **123**(6): P. 2834-40.
  43. BACZYK, D., J.C. KINGDOM, AND P. UHLEN, *CALCIUM SIGNALING IN PLACENTA. CELL CALCIUM*, 2011. **49**(5): P. 350-6.
  44. LAFOND, J., M. LECLERC, AND M.G. BRUNETTE, *CHARACTERIZATION OF CALCIUM TRANSPORT BY BASAL PLASMA MEMBRANES FROM HUMAN PLACENTAL SYNCYTIOTROPHOBLAST. J CELL PHYSIOL*, 1991. **148**(1): P. 17-23.
  45. HAHN, T., ET AL., *LOCALISATION OF THE HIGH AFFINITY FACILITATIVE GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN GLUT 1 IN THE PLACENTA OF HUMAN, MARMOSET MONKEY (CALLITHRIX JACCHUS) AND RAT AT DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES. CELL TISSUE RES*, 1995. **280**(1): P. 49-57.
  46. HONG, E.J., ET AL., *EFFECTS OF CALCITONIN AND PARATHYROID HORMONE ON THE REGULATION OF CALBINDIN-D(9K) IN THE UTERUS, PLACENTA, AND FETAL MEMBRANE OF RATS RELATED TO BLOOD CALCIUM LEVEL DURING LATE GESTATION. MOL REPROD DEV*, 2007. **74**(9): P. 1188-97.
  47. LAFOND, J., ET AL., *CALCITONIN RECEPTOR IN HUMAN PLACENTAL SYNCYTIOTROPHOBLAST BRUSH BORDER AND BASAL PLASMA MEMBRANES. MOL CELL ENDOCRINOL*, 1994. **99**(2): P. 285-92.
  48. CLEAL, J.K. AND R.M. LEWIS, *THE MECHANISMS AND REGULATION OF PLACENTAL AMINO ACID TRANSPORT TO THE HUMAN FOETUS. J NEUROENDOCRINOL*, 2008. **20**(4): P. 419-26.
  49. GACCIOLI, F., ET AL., *EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF SYSTEM L AMINO ACID TRANSPORTERS IN THE HUMAN TERM PLACENTA. REPROD BIOL ENDOCRINOL*, 2015. **13**: P. 57.
  50. HAGGARTY, P., *PLACENTAL REGULATION OF FATTY ACID DELIVERY AND ITS EFFECT ON FETAL GROWTH--A REVIEW. PLACENTA*, 2002. **23** SUPPL A: P. S28-38.
  51. HANE BUTT, F.L., ET AL., *LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACID (LC-PUFA) TRANSFER ACROSS THE PLACENTA. CLIN NUTR*, 2008. **27**(5): P. 685-93.
  52. CAMPBELL, F.M., ET AL., *DETECTION AND CELLULAR LOCALIZATION OF PLASMA MEMBRANE-ASSOCIATED AND CYTOPLASMIC FATTY*

- ACID-BINDING PROTEINS IN HUMAN PLACENTA*. PLACENTA, 1998. **19**(5-6): P. 409-15.
53. DUTTA-ROY, A.K., *TRANSPORT MECHANISMS FOR LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN THE HUMAN PLACENTA*. AM J CLIN NUTR, 2000. **71**(1 SUPPL): P. 315S-22S.
  54. LARQUE, E., ET AL., *DOCOSAHEXAENOIC ACID SUPPLY IN PREGNANCY AFFECTS PLACENTAL EXPRESSION OF FATTY ACID TRANSPORT PROTEINS*. AM J CLIN NUTR, 2006. **84**(4): P. 853-61.
  55. WADSACK, C., ET AL., *SELECTIVE CHOLESTERYL ESTER UPTAKE FROM HIGH DENSITY LIPOPROTEIN BY HUMAN FIRST TRIMESTER AND TERM VILLOUS TROPHOBLAST CELLS*. PLACENTA, 2003. **24**(2-3): P. 131-43.
  56. JIANG, Z.G., S.C. ROBSON, AND Z. YAO, *LIPOPROTEIN METABOLISM IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE*. J BIOMED RES, 2013. **27**(1): P. 1-13.
  57. MAHLEY, R.W., ET AL., *PLASMA LIPOPROTEINS: A LIPOPROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION*. J LIPID RES, 1984. **25**(12): P. 1277-94.
  58. GO, G.W. AND A. MANI, *LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDLR) FAMILY ORCHESTRATES CHOLESTEROL HOMEOSTASIS*. YALE J BIOL MED, 2012. **85**(1): P. 19-28.
  59. KWITEROVICH, P.O., JR., *THE METABOLIC PATHWAYS OF HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN, LOW-DENSITY LIPOPROTEIN, AND TRIGLYCERIDES: A CURRENT REVIEW*. AM J CARDIOL, 2000. **86**(12A): P. 5L-10L.
  60. MAGNUSSON, A.L., ET AL., *TRIGLYCERIDE HYDROLASE ACTIVITIES AND EXPRESSION OF FATTY ACID BINDING PROTEINS IN THE HUMAN PLACENTA IN PREGNANCIES COMPLICATED BY INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION AND DIABETES*. J CLIN ENDOCRINOL METAB, 2004. **89**(9): P. 4607-14.
  61. STEFULJ, J., ET AL., *HUMAN ENDOTHELIAL CELLS OF THE PLACENTAL BARRIER EFFICIENTLY DELIVER CHOLESTEROL TO THE FETAL CIRCULATION VIA ABCA1 AND ABCG1*. CIRC RES, 2009. **104**(5): P. 600-8.
  62. AYE, I.L., ET AL., *PLACENTAL ABCA1 AND ABCG1 TRANSPORTERS EFFLUX CHOLESTEROL AND PROTECT TROPHOBLASTS FROM OXYSTEROL INDUCED TOXICITY*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 2010. **1801**(9): P. 1013-24.
  63. WANG, Q., H. FUJII, AND G.T. KNIPP, *EXPRESSION OF PPAR AND RXR ISOFORMS IN THE DEVELOPING RAT AND HUMAN TERM PLACENTAS*. PLACENTA, 2002. **23**(8-9): P. 661-71.
  64. LARKIN, J.C., S.B. SEARS, AND Y. SADOVSKY, *THE INFLUENCE OF LIGAND-ACTIVATED LXR ON PRIMARY HUMAN TROPHOBLASTS*. PLACENTA, 2014. **35**(11): P. 919-24.

65. BENGOCHEA-ALONSO, M.T. AND J. ERICSSON, *SREBP IN SIGNAL TRANSDUCTION: CHOLESTEROL METABOLISM AND BEYOND*. CURR OPIN CELL BIOL, 2007. **19**(2): P. 215-22.
66. AYE, I.L., ET AL., *OXYSTEROLS INHIBIT DIFFERENTIATION AND FUSION OF TERM PRIMARY TROPHOBLASTS BY ACTIVATING LIVER X RECEPTORS*. PLACENTA, 2011. **32**(2): P. 183-91.
67. DU, X. AND H. YANG, *ENDOSOMAL CHOLESTEROL TRAFFICKING: PROTEIN FACTORS AT A GLANCE*. ACTA BIOCHIM BIOPHYS SIN (SHANGHAI), 2013. **45**(1): P. 11-7.
68. PENTCHEV, P.G., *NIEMANN-PICK C RESEARCH FROM MOUSE TO GENE*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 2004. **1685**(1-3): P. 3-7.
69. LI, A.C., ET AL., *LOCALIZATION OF 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COA REDUCTASE AND 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COA SYNTHASE IN THE RAT LIVER AND INTESTINE IS AFFECTED BY CHOLESTYRAMINE AND MEVINOLIN*. J LIPID RES, 1988. **29**(6): P. 781-96.
70. VANIER, M.T., ET AL., *TYPE C NIEMANN-PICK DISEASE: SPECTRUM OF PHENOTYPIC VARIATION IN DISRUPTION OF INTRACELLULAR LDL-DERIVED CHOLESTEROL PROCESSING*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 1991. **1096**(4): P. 328-37.
71. LISCUM, L., *NIEMANN-PICK TYPE C MUTATIONS CAUSE LIPID TRAFFIC JAM*. TRAFFIC, 2000. **1**(3): P. 218-25.
72. ORY, D.S., *NIEMANN-PICK TYPE C: A DISORDER OF CELLULAR CHOLESTEROL TRAFFICKING*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 2000. **1529**(1-3): P. 331-9.
73. PENTCHEV, P.G., ET AL., *A DEFECT IN CHOLESTEROL ESTERIFICATION IN NIEMANN-PICK DISEASE (TYPE C) PATIENTS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1985. **82**(23): P. 8247-51.
74. KLEIN, A., ET AL., *NPC2 IS EXPRESSED IN HUMAN AND MURINE LIVER AND SECRETED INTO BILE: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR BODY CHOLESTEROL HOMEOSTASIS*. HEPATOLOGY, 2006. **43**(1): P. 126-33.
75. ONG, W.Y., ET AL., *NEURONAL LOCALIZATION AND ASSOCIATION OF NIEMANN PICK C2 PROTEIN (HE1/NPC2) WITH THE POSTSYNAPTIC DENSITY*. NEUROSCIENCE, 2004. **128**(3): P. 561-70.
76. MUTKA, A.L., ET AL., *SECRETION OF STEROLS AND THE NPC2 PROTEIN FROM PRIMARY ASTROCYTES*. J BIOL CHEM, 2004. **279**(47): P. 48654-62.
77. NAURECKIENE, S., ET AL., *IDENTIFICATION OF HE1 AS THE SECOND GENE OF NIEMANN-PICK C DISEASE*. SCIENCE, 2000. **290**(5500): P. 2298-301.
78. JIA, L., J.L. BETTERS, AND L. YU, *NIEMANN-PICK C1-LIKE 1 (NPC1L1) PROTEIN IN INTESTINAL AND HEPATIC CHOLESTEROL TRANSPORT*. ANNU REV PHYSIOL, 2011. **73**: P. 239-59.



79. ALTMANN, S.W., ET AL., *NIEMANN-PICK C1 LIKE 1 PROTEIN IS CRITICAL FOR INTESTINAL CHOLESTEROL ABSORPTION*. SCIENCE, 2004. **303**(5661): P. 1201-4.
80. YU, L., ET AL., *CHOLESTEROL-REGULATED TRANSLOCATION OF NPC1L1 TO THE CELL SURFACE FACILITATES FREE CHOLESTEROL UPTAKE*. J BIOL CHEM, 2006. **281**(10): P. 6616-24.
81. CARSTEADT, E.D., ET AL., *NIEMANN-PICK C1 DISEASE GENE: HOMOLOGY TO MEDIATORS OF CHOLESTEROL HOMEOSTASIS*. SCIENCE, 1997. **277**(5323): P. 228-31.
82. HIGGINS, M.E., ET AL., *NIEMANN-PICK C1 IS A LATE ENDOSOME-RESIDENT PROTEIN THAT TRANSIENTLY ASSOCIATES WITH LYOSOMES AND THE TRANS-GOLGI NETWORK*. MOL GENET METAB, 1999. **68**(1): P. 1-13.
83. ORY, D.S., *THE NIEMANN-PICK DISEASE GENES; REGULATORS OF CELLULAR CHOLESTEROL HOMEOSTASIS*. TRENDS CARDIOVASC MED, 2004. **14**(2): P. 66-72.
84. DAVIES, J.P. AND Y.A. IOANNOU, *TOPOLOGICAL ANALYSIS OF NIEMANN-PICK C1 PROTEIN REVEALS THAT THE MEMBRANE ORIENTATION OF THE PUTATIVE STEROL-SENSING DOMAIN IS IDENTICAL TO THOSE OF 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COA REDUCTASE AND STEROL REGULATORY ELEMENT BINDING PROTEIN CLEAVAGE-ACTIVATING PROTEIN*. J BIOL CHEM, 2000. **275**(32): P. 24367-74.
85. INFANTE, R.E., ET AL., *PURIFIED NPC1 PROTEIN: II. LOCALIZATION OF STEROL BINDING TO A 240-AMINO ACID SOLUBLE LUMINAL LOOP*. J BIOL CHEM, 2008. **283**(2): P. 1064-75.
86. INFANTE, R.E., ET AL., *PURIFIED NPC1 PROTEIN. I. BINDING OF CHOLESTEROL AND OXYSTEROLS TO A 1278-AMINO ACID MEMBRANE PROTEIN*. J BIOL CHEM, 2008. **283**(2): P. 1052-63.
87. STORCH, J. AND Z. XU, *NIEMANN-PICK C2 (NPC2) AND INTRACELLULAR CHOLESTEROL TRAFFICKING*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 2009. **1791**(7): P. 671-8.
88. XU, S., ET AL., *STRUCTURAL BASIS OF STEROL BINDING BY NPC2, A LYSOSOMAL PROTEIN DEFICIENT IN NIEMANN-PICK TYPE C2 DISEASE*. J BIOL CHEM, 2007. **282**(32): P. 23525-31.
89. BROWN, M.S. AND J.L. GOLDSTEIN, *A RECEPTOR-MEDIATED PATHWAY FOR CHOLESTEROL HOMEOSTASIS*. SCIENCE, 1986. **232**(4746): P. 34-47.
90. KWON, H.J., ET AL., *STRUCTURE OF N-TERMINAL DOMAIN OF NPC1 REVEALS DISTINCT SUBDOMAINS FOR BINDING AND TRANSFER OF CHOLESTEROL*. CELL, 2009. **137**(7): P. 1213-24.
91. YU, X., ET AL., *OxLDL UP-REGULATES NIEMANN-PICK TYPE C1 EXPRESSION THROUGH ERK1/2/COX-2/PPAR $\alpha$ -SIGNALING*



- PATHWAY IN MACROPHAGES. ACTA BIOCHIM BIOPHYS SIN (SHANGHAI), 2012. **44**(2): P. 119-28.
92. GELSTHORPE, M.E., ET AL., *NIEMANN-PICK TYPE C1 I1061T MUTANT ENCODES A FUNCTIONAL PROTEIN THAT IS SELECTED FOR ENDOPLASMIC RETICULUM-ASSOCIATED DEGRADATION DUE TO PROTEIN MISFOLDING*. J BIOL CHEM, 2008. **283**(13): P. 8229-36.
  93. DU, X., ET AL., *AKT ACTIVATION INCREASES CELLULAR CHOLESTEROL BY PROMOTING THE PROTEASOMAL DEGRADATION OF NIEMANN-PICK C1*. BIOCHEM J, 2015. **471**(2): P. 243-53.
  94. YAMANASHI, Y., ET AL., *NOVEL FUNCTION OF NIEMANN-PICK C1-LIKE 1 AS A NEGATIVE REGULATOR OF NIEMANN-PICK C2 PROTEIN*. HEPATOLOGY, 2012. **55**(3): P. 953-64.
  95. YU, L., ET AL., *DISRUPTION OF ABCG5 AND ABCG8 IN MICE REVEALS THEIR CRUCIAL ROLE IN BILIARY CHOLESTEROL SECRETION*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2002. **99**(25): P. 16237-42.
  96. YAMANASHI, Y., ET AL., *NPC2 REGULATES BILIARY CHOLESTEROL SECRETION VIA STIMULATION OF ABCG5/G8-MEDIATED CHOLESTEROL TRANSPORT*. GASTROENTEROLOGY, 2011. **140**(5): P. 1664-74.
  97. VAINIO, S., ET AL., *DEFECTIVE INSULIN RECEPTOR ACTIVATION AND ALTERED LIPID RAFTS IN NIEMANN-PICK TYPE C DISEASE HEPATOCYTES*. BIOCHEM J, 2005. **391**(PT 3): P. 465-72.
  98. FLETCHER, R., ET AL., *THE ROLE OF THE NIEMANN-PICK DISEASE, TYPE C1 PROTEIN IN ADIPOCYTE INSULIN ACTION*. PLOS ONE, 2014. **9**(4): P. E95598.
  99. NOMURA, M., ET AL., *INHIBITION OF HEPATIC NIEMANN-PICK C1-LIKE 1 IMPROVES HEPATIC INSULIN RESISTANCE*. AM J PHYSIOL ENDOCRINOL METAB, 2009. **297**(5): P. E1030-8.
  100. LUCZYNSKI, W., ET AL., *POLYMORPHISM OF THE FTO GENE INFLUENCES BODY WEIGHT IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES WITHOUT SEVERE OBESITY*. INT J ENDOCRINOL, 2014. **2014**: P. 630712.
  101. GARVER, W.S., ET AL., *DIFFERENTIAL ASSOCIATION OF NIEMANN-PICK C1 GENE POLYMORPHISMS WITH MATERNAL PREPREGNANCY OVERWEIGHT AND GESTATIONAL DIABETES*. J DIABETES OBES, 2015. **2**(1).
  102. JELINEK, D., ET AL., *THE C57BL/6J NIEMANN-PICK C1 MOUSE MODEL WITH DECREASED GENE DOSAGE IS SUSCEPTIBLE TO INCREASED WEIGHT GAIN WHEN FED A HIGH-FAT DIET: CONFIRMATION OF A GENE-DIET INTERACTION*. GENE, 2015. **568**(1): P. 112-3.
  103. BAMBACE, C., ET AL., *NPC1 IN HUMAN WHITE ADIPOSE TISSUE AND OBESITY*. BMC ENDOCR DISORD, 2013. **13**: P. 5.

104. JELINEK, D., ET AL., *DECREASED NPC1 GENE DOSAGE IN MICE IS ASSOCIATED WITH WEIGHT GAIN*. OBESITY (SILVER SPRING), 2010. **18**(7): P. 1457-9.
105. JELINEK, D., ET AL., *NPC1 HAPLOINSUFFICIENCY PROMOTES WEIGHT GAIN AND METABOLIC FEATURES ASSOCIATED WITH INSULIN RESISTANCE*. HUM MOL GENET, 2011. **20**(2): P. 312-21.
106. HIRSCHMUGL, B., ET AL., *MATERNAL OBESITY MODULATES INTRACELLULAR LIPID TURNOVER IN THE HUMAN TERM PLACENTA*. INT J OBES (LOND), 2016.
107. SOLIS-PAREDES, M., ET AL., *MATERNAL AND FETAL LIPID AND ADIPOKINE PROFILES AND THEIR ASSOCIATION WITH OBESITY*. INT J ENDOCRINOL, 2016. **2016**: P. 7015626.
108. WEI, Y.M., ET AL., *RISK OF ADVERSE PREGNANCY OUTCOMES STRATIFIED FOR PRE-PREGNANCY BODY MASS INDEX*. J MATERN FETAL NEONATAL MED, 2016. **29**(13): P. 2205-9.
109. CINELLI, G., ET AL., *INFLUENCE OF MATERNAL OBESITY AND GESTATIONAL WEIGHT GAIN ON MATERNAL AND FOETAL LIPID PROFILE*. NUTRIENTS, 2016. **8**(6).
110. SCIFRES, C.M., J.M. CATOV, AND H.N. SIMHAN, *THE IMPACT OF MATERNAL OBESITY AND GESTATIONAL WEIGHT GAIN ON EARLY AND MID-PREGNANCY LIPID PROFILES*. OBESITY (SILVER SPRING), 2014. **22**(3): P. 932-8.
111. MARIMAN, E.C., ET AL., *EXTREME OBESITY IS ASSOCIATED WITH VARIATION IN GENES RELATED TO THE CIRCADIAN RHYTHM OF FOOD INTAKE AND HYPOTHALAMIC SIGNALING*. PHYSIOL GENOMICS, 2015. **47**(6): P. 225-31.
112. MEYRE, D., ET AL., *GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY FOR EARLY-ONSET AND MORBID ADULT OBESITY IDENTIFIES THREE NEW RISK LOCI IN EUROPEAN POPULATIONS*. NAT GENET, 2009. **41**(2): P. 157-9.
113. AL-DAGHRI, N.M., ET AL., *MAMMALIAN NPC1 GENES MAY UNDERGO POSITIVE SELECTION AND HUMAN POLYMORPHISMS ASSOCIATE WITH TYPE 2 DIABETES*. BMC MED, 2012. **10**: P. 140.
114. YAGYU, H., ET AL., *EZETIMIBE, AN INHIBITOR OF NIEMANN-PICK C1-LIKE 1 PROTEIN, DECREASES CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS*. ENDOCR J, 2012. **59**(12): P. 1077-84.
115. TOMKIN, G.H., *TARGETS FOR INTERVENTION IN DYSLIPIDEMIA IN DIABETES*. DIABETES CARE, 2008. **31** SUPPL 2: P. S241-8.
116. ONG, Q.R., ET AL., *IMPAIRED INSULIN SIGNALING IN AN ANIMAL MODEL OF NIEMANN-PICK TYPE C DISEASE*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 2012. **424**(3): P. 482-7.
117. PRAGGASTIS, M., ET AL., *A MURINE NIEMANN-PICK C1 I1061T KNOCK-IN MODEL RECAPITULATES THE PATHOLOGICAL FEATURES*

- OF THE MOST PREVALENT HUMAN DISEASE ALLELE. *J NEUROSCI*, 2015. **35**(21): P. 8091-106.
118. KANG, Y.E., ET AL., *THE ROLES OF ADIPOKINES, PROINFLAMMATORY CYTOKINES, AND ADIPOSE TISSUE MACROPHAGES IN OBESITY-ASSOCIATED INSULIN RESISTANCE IN MODEST OBESITY AND EARLY METABOLIC DYSFUNCTION*. *PLOS ONE*, 2016. **11**(4): P. E0154003.
  119. SCHMIDT, F.M., ET AL., *INFLAMMATORY CYTOKINES IN GENERAL AND CENTRAL OBESITY AND MODULATING EFFECTS OF PHYSICAL ACTIVITY*. *PLOS ONE*, 2015. **10**(3): P. E0121971.
  120. GEVRY, N., ET AL., *CHOLESTEROL SUPPLY AND SREBPS MODULATE TRANSCRIPTION OF THE NIEMANN-PICK C-1 GENE IN STEROIDOGENIC TISSUES*. *J LIPID RES*, 2008. **49**(5): P. 1024-33.
  121. NANDIPATI, K.C., S. SUBRAMANIAN, AND D.K. AGRAWAL, *PROTEIN KINASES: MECHANISMS AND DOWNSTREAM TARGETS IN INFLAMMATION-MEDIATED OBESITY AND INSULIN RESISTANCE*. *MOL CELL BIOCHEM*, 2016.
  122. LIAO, Y.J., ET AL., *NIEMANN-PICK TYPE C2 PROTEIN REGULATES LIVER CANCER PROGRESSION VIA MODULATING ERK1/2 PATHWAY: CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATIONS AND THERAPEUTICAL IMPLICATIONS*. *INT J CANCER*, 2015. **137**(6): P. 1341-51.
  123. SCHMID, K.E., ET AL., *TRANSPORT OF CHOLESTEROL ACROSS A BEWO CELL MONOLAYER: IMPLICATIONS FOR NET TRANSPORT OF STEROL FROM MATERNAL TO FETAL CIRCULATION*. *J LIPID RES*, 2003. **44**(10): P. 1909-18.
  124. MOREAU, R., L. SIMONEAU, AND J. LAFOND, *CHARACTERISTICS OF CALCIUM UPTAKE BY BEWO CELLS, A HUMAN TROPHOBLAST CELL LINE*. *PLACENTA*, 2001. **22**(8-9): P. 768-75.
  125. VANIER, M.T. AND P. LATOUR, *LABORATORY DIAGNOSIS OF NIEMANN-PICK DISEASE TYPE C: THE FILIPIN STAINING TEST*. *METHODS CELL BIOL*, 2015. **126**: P. 357-75.